



Obtención y caracterización de pectinas modificadas mediante tratamientos químicos y físicos

Trabajo Fin de Máster

MÁSTER EN QUÍMICA AGRÍCOLA Y NUEVOS ALIMENTOS

NEREA MUÑOZ ALMAGRO

Directores:

Dr. Francisco Javier Moreno Andújar y Dra. María del Mar Villamiel Guerra

Tutora:

Dra. Tiziana Fornari Reale

Octubre 2015



Esta actividad de investigación, fundamentada como Trabajo Fin de Máster, es la culminación del “Máster Química Agrícola y Nuevos Alimentos”, realizado durante el intervalo del Curso 2014-2015. Este trabajo lleva por título “Obtención y caracterización de pectinas modificadas mediante tratamientos químicos y físicos”, y ha sido llevado a cabo en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL, bajo la dirección y supervisión del Dr. Francisco Javier Moreno Andújar y la Dra. María del Mar Villamiel Guerra (CSIC), siendo la Dra. Tiziana Fornari Reale (UAM) la tutora del mismo.

Madrid, a 16 de Septiembre de 2015

Vº Bueno de Directores y Tutora

Fdo:

Dr. Francisco Javier Moreno Andújar Dra. M^a Mar Villamiel Guerra Dra. Tiziana Fornari Reale

A mi familia

A mis amigos

A mis directores

Gracias por tanto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.	viii
ABREVIATURAS.	ix
RESUMEN.	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Gestión de residuos en la industria hortofrutícola e interés hacia la alimentación funcional.....	1
1.2. Pectinas.	2
1.2.1. Características estructurales	2
1.2.2. Propiedades tecnológicas y aplicaciones en la industria alimentaria	4
1.2.3. Propiedades biológicas y aplicaciones en la industria farmacéutica	6
1.3. Métodos de despolimerización de polisacáridos	8
1.4. Tratamientos por ultrasonidos	10
1.4.1. Fundamentos y aplicaciones	10
1.4.2. Los ultrasonidos como método de despolimerización	12
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Reactivos y muestras	15
3.2. Purificación de la materia prima	15
3.2.1. Pectina de manzana	15
3.2.2. Pectina de cítricos	16
3.3. Puesta a punto de los equipos de US	17
3.3.1. Con baño de ultrasonidos	17
3.3.2. Con sonda de ultrasonidos	17
3.4. Tratamientos de despolimerización de pectinas	17
3.4.1. Con ácidos	17
3.4.2. Con baño de ultrasonidos	18
3.4.3. Con sonda de ultrasonidos	18
3.4.4. Con ácidos y sonda de ultrasonidos	19

3.5. Métodos analíticos	19
3.5.1. Determinación del pH, actividad del agua (Aw) y extracto seco	19
3.5.2. Análisis de minerales	20
3.5.3. Determinación de la composición monomérica	20
3.5.4. Estimación del grado de esterificación (DE) mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	21
3.5.5. Estimación y distribución de la masa molecular (Mw) mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC)	21
3.5.6. Determinación del poder reductor mediante ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	22
3.5.7. Determinación de la turbidez	23
3.5.8. Determinación de la actividad antioxidante (AA)	23
3.5.9. Análisis estadístico	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Purificación de la materia prima	24
4.2. Caracterización físico-química.	25
4.2.1. Determinación del pH, actividad del agua (Aw), extracto seco y ácido galacturónico	25
4.2.2. Análisis de minerales	26
4.3. Determinación cualitativa de la composición monomérica	28
4.4. Puesta a punto de los equipos por US	31
4.4.1. Con baño de ultrasonidos	31
4.4.2. Con sonda de ultrasonidos	32
4.5. Tratamientos de despolimerización de pectinas	35
4.5.1. Con ácidos	35
4.5.2. Con baño de ultrasonidos	36
4.5.2.1. Determinación del poder reductor mediante DNS	36
4.5.2.2. Estimación y distribución de la Mw mediante SEC	36
4.5.3. Con sonda de ultrasonidos	37
4.5.3.1. Determinación del poder reductor mediante DNS	37
4.5.3.2. Estimación y distribución de la Mw mediante SEC	38

4.5.3.3. Determinación de la turbidez	40
4.5.3.4. Estimación del grado de esterificación (DE) por FTIR	41
4.5.3.5. Determinación del ácido galacturónico	45
4.5.4. Con ácidos y sonda de ultrasonidos	46
4.5.4.1. Estimación y distribución de la Mw mediante SEC	46
4.6. Determinación de la actividad antioxidante	48
5. CONCLUSIONES	50
6. BIBLIOGRAFÍA.	51

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Estructura básica de la pectina.....	3
Figura 2. Reacción de β -eliminación entre moléculas de ácido galacturónico metoxilados	8
Figura 3. Esquema de la acción enzimática de las pectinasas.....	9
Figura 4. Esquema del fenómeno de cavitación	10
Figura 5. Plan de trabajo llevado a cabo en la presente memoria.	14
Figura 6. Pectina manzana purificada y aguas de lavado tras la purificación.....	15
Figura 7. Pectina de cítricos purificada y aguas de lavado tras la purificación.	16
Figura 8. Sonicador de 250 W y sondas utilizadas.	18
Figura 9. Curva de calibrado empleada para estimar la M_w de las pectinas.	22
Figura 10. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la PMC, PMP y las correspondientes aguas de lavado	24
Figura 11. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la PCC, PCP y las correspondientes aguas de lavado	25
Figura 12. Perfil cromatográfico determinado por HPAEC-PAD de los patrones individuales y de las mezclas de patrones correspondientes a los posibles azúcares presentes en las pectinas	29
Figura 13. Comparación de los perfiles cromatográficos de la PMP y la mezcla de azúcares determinados por HPAEC-PAD.	30
Figura 14. Comparación de los perfiles cromatográficos de la PCP y la mezcla de azúcares determinados por HPAEC-PAD.	30
Figura 15. Representaciones gráficas de las variaciones de temperatura en función del tiempo en modo continuo y pulsado	31
Figura 16. Representaciones gráficas de las variaciones de temperatura en función del tiempo y amplitud para cada modo de operación de US.....	32
Figura 17. Representaciones gráficas de las variaciones de temperatura en función del tiempo y modo de operación para cada amplitud de US.....	33
Figura 18. Representaciones gráficas de las variaciones de las concentraciones de azúcares reductores liberados de PMP en HCl, HNO ₃ y H ₂ SO ₄ a 30 min y 1 h según el método del DNS. ...	35

Figura 19. Representación gráfica de las variaciones de las concentraciones de azúcares liberados reductores en los tratamientos con baño US.	36
Figura 20. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la muestra control y de las tratadas de PMP en modo continuo y en modo pulsado mediante US baño	36
Figura 21. Representación gráfica de las variaciones de las concentraciones de azúcares liberados reductores de PMP y PCP en los tratamientos US sonda.	37
Figura 22. Perfil cromatográfico obtenido por SEC del control y de las muestras tratadas de PMP a los 30 min en el equipo de 250 W y 450 W y a los 60 min en el sonicador 250 W y 450 W mediante US sonda..	38
Figura 23. Perfil cromatográfico obtenido por SEC del control y muestras tratadas de PCP a los 30 min en el equipo de 250 W y 450 W y a los 60 min en el sonicador 250 W y 450 W mediante US sonda..	39
Figura 24. Representación gráfica de las variaciones de turbidez en las muestras PMP y PCP.....	41
Figura 25. Espectros FTIR de la PMP: A) Control B) Sonicada 60 min en el US 450 W..	42
Figura 26. Espectros FTIR de la PCP: A) Control B) Sonicada 60 min en el US 450 W..	44
Figura 27. Representación gráfica de las variaciones del contenido de ácido galacturónico en las muestras tratadas de PMP y PCP con respecto a sus correspondientes controles.	45
Figura 28. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la muestra control, de los tratamientos de PMP en H ₂ O a los 30 min y 60 min y en presencia de HNO ₃ a los 30 min y a los 60 min mediante US sonda..	46
Figura 29. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la muestra control, de los tratamientos de PCP en H ₂ O a los 30 min y 60 min y, en presencia de HNO ₃ , a los 30 min y a los 60 min mediante US sonda..	47
Figura 30. Representaciones gráficas del efecto de los tratamientos con sonda US sobre la actividad antioxidante de PMP y PCP..	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sonificadores, sondas y condiciones utilizadas para las muestras PMP y PCP	19
Tabla 2. Determinación de extracto seco, Aw, pH y contenido de ácido galacturónico, en la pectina de manzana y de cítricos comerciales (PMC y PCC) y purificadas (PMP y PCP)	26
Tabla 3. Análisis semicuantitativo de minerales en la PMC y PCC	27
Tabla 4. Potencias obtenidas en modo continuo y pulsado a distintas temperaturas en baño US.	31
Tabla 5. Potencias obtenidas en modo continuo a distintas temperaturas y amplitudes en el equipo con sonda de US 450 W	34
Tabla 6. Potencias obtenidas en modo pulsado (ON 1 s/ OFF 1 s) a distintas temperaturas y amplitudes en el equipo con sonda de US 450 W	34
Tabla 7. Potencias obtenidas en modo pulsado (ON 2 s/ OFF 1 s) a distintas temperaturas y amplitudes en el equipo con sonda de US 450 W	34
Tabla 8. Estimación y distribución de la Mw y porcentaje de despolimerización obtenidas en las muestras PMP tratadas en baño de US.....	37
Tabla 9. Estimación y distribución de Mw y porcentaje de despolimerización obtenidas en las muestras PMP tratadas por US sonda	39
Tabla 10. Estimación y distribución de Mw y porcentaje de despolimerización obtenidas en las muestras PCP tratadas por US sonda	40
Tabla 11. Bandas correspondientes al espectro FTIR de los controles y PMP tratadas en los sonificadores 250 y 450 W a tiempos de 30 y 60 min.....	43
Tabla 12. Bandas correspondientes al espectro FTIR de los controles y PCP tratadas en los sonificadores 250 y 450 W a tiempos de 30 y 60 min.....	45
Tabla 13. Estimación y distribución de Mw y porcentaje de despolimerización obtenido en las muestras PMP tratadas en presencia de H ₂ O y HNO ₃ por sonda US.....	47
Tabla 14. Estimación y distribución de Mw y porcentaje de despolimerización obtenido en las muestras PCP tratadas en presencia de H ₂ O y HNO ₃ por sonda US.....	48

ABREVIATURAS

AA	Actividad Antioxidante
A _w	Actividad de agua
DDPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
DE	Grado de esterificación
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
HG	Homogalacturonano
HM	Alto metoxilo
HPAEC-PAD	Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alta Resolución con Detección Amperométrica de Pulsos
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo
LM	Bajo metoxilo
M _w	Masa molecular
PCC	Pectina de Cítricos Comercial
PCP	Pectina de Cítricos Purificada
PE	Pectinesterasa
PG	Poligalacturonasa
PGL	Poligalacturonato liasa
PMC	Pectina de Manzana Comercial
PMG	Polimetilgalacturonasa
PMP	Pectina de Manzana Purificada
PMGL	Polimetil-galacturonasa liasa
POS	Oligosacáridos pécticos no digeribles
RGI	Ramnogalacturonano I
RGII	Ramnogalacturonano II
SEC	Cromatografía de Exclusión Molecular
SFCA	Ácidos grasos de cadena corta
SIdI-UAM	Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid
TFA	Ácido trifluoroacético
UE	Unión Europea
US	Ultrasonidos

RESUMEN

A pesar de que las pectinas se emplean en formulaciones farmacéuticas, es en la industria alimentaria donde pueden encontrar más aplicaciones debido a sus propiedades tecnológicas. En los últimos años, existe un creciente interés hacia las pectinas debido a su importancia como fibra dietética, así como por otras propiedades bioactivas.

La composición, estructura y propiedades de las pectinas dependen de su fuente de origen y de las condiciones de obtención. Durante su proceso de obtención pueden ser transformadas en fracciones con diferentes características estructurales y funcionales. El empleo de tecnologías emergentes como los ultrasonidos de alta intensidad (US) es una forma eficaz, económica y sostenible de despolimerización de biomoléculas. Esta técnica se basa en la degradación mecánica durante el colapso de burbujas (20-100 kHz) por cavitación.

El objetivo general de este trabajo ha sido la aplicación de diferentes técnicas analíticas para evaluar los cambios en la estructura y en la actividad antioxidante de pectinas tratadas con US. Por ello, soluciones acuosas y ácidas de pectina de manzana y de cítricos se trataron en un baño de ultrasonidos (45 kHz) y en un sonicador (20 kHz) provisto de dos sondas de 3 y 12,7 mm a amplitudes de 30, 50 y 70% a 45°C. Los resultados de la pectina de cítricos indicaron una reducción en la masa molecular (M_w) de un 87%, mientras que en la pectina de manzana la disminución de M_w alcanzó el 51%.

Asimismo, el grado de esterificación y el contenido en ácido galacturónico disminuyeron con la intensidad del tratamiento por US y la actividad antioxidante apenas se vio modificada. Los resultados obtenidos indican que los US son herramientas útiles para obtener pectinas modificadas con potencial bioactividad.

ABSTRACT

Although pectins are used in pharmaceutical formulations, it is in the food industry where they can find more applications due to their technological properties. During the last years increasing interest toward pectins is arousing due to their bioactivity derived from their role as dietary fiber, among other properties.

The composition, structure and properties of pectins depend on the sources and conditions of their obtainment. Moreover, the obtained pectins can be transformed into fractions with different structural and functional characteristics. The application of emergent technologies such as high intensity ultrasound (US) is an effective, economical and environmentally friendly way for depolymerisation of biomolecules. This technique is based on the mechanical degradation during collapse of bubbles (20-100 kHz) by cavitation.

The main aim of this work has been the application of different analytical techniques to evaluate the structural changes and the modifications in the antioxidant activity of the pectin subjected to power US. Aqueous and acid solutions of apple and citrus pectin were treated in an ultrasonic bath (45 kHz) and in a sonicator (20 kHz) provided by two probes of 3 and 12.7 mm at 30, 50 and 70% of amplitude, controlling the temperature to 45°C. Regarding to citrus pectin, the results indicated a M_w reduction of 87%, while in the apple pectin the M_w reduction reached 51%. Likewise, the esterification of degree and the content of galacturonic acid decreased with the intensity of ultrasound and, in the antioxidant activity, hardly any change was observed. The obtained results indicated that US are a useful tool to obtain modified pectins with potential bioactivity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Gestión de residuos en la industria hortofrutícola e interés hacia la alimentación funcional

La gestión de un gran volumen de residuos junto con la revalorización sostenible de subproductos generados en la industria hortofrutícola supone una preocupación constante, no solo a nivel económico sino también mediambiental. Con el fin de paliar las consecuencias que conlleva la repercusión de dicho problema, la UE establece, mediante la *Ley de Residuos y Suelos Contaminados* (Directiva 98/2008/CE), la obligación de los Estados Miembros de fomentar tanto la prevención de los impactos adversos de la gestión de residuos como la reducción de subproductos mediante su valorización a través de la reutilización, recuperación y reciclado [1, 2, 3].

Actualmente, la mayor parte de los subproductos procedentes de la industria hortofrutícola están destinados a la alimentación animal, originándose beneficios tanto para los ganaderos como para las empresas del sector. Por un lado, la industria facilita a los ganaderos la recogida de sus subproductos debido a los grandes problemas que tiene para eliminarlos, y por otro, el ganadero obtiene a bajo coste un subproducto vegetal disponible y con gran valor nutritivo para la alimentación de su ganado [4]. Sin embargo, este bajo coste puede incrementarse considerablemente en aquellos casos donde sea necesario el transporte como solución a las grandes distancias que existen entre las ganaderías y las industrias hortofrutícolas [5]. Aunque la mayor parte de subproductos se emplean para alimentación animal, existe una pequeña proporción destinada a la obtención de nuevos ingredientes alimentarios, dado su alto valor añadido.

El aumento de la incidencia de algunas enfermedades, la ingesta excesiva de calorías y los cambios en el estilo de vida, son algunos de los factores que han generado una mayor sensibilización de la sociedad hacia la necesidad de crear hábitos de vida saludables que eviten, en la medida de lo posible, el desarrollo de patologías crónicas de cierta gravedad. Por todo ello, la búsqueda de ingredientes alimentarios bioactivos está siendo un objetivo prioritario en las líneas de investigación actuales. Además, conseguir mejores alimentos enriquecidos o fortificados con algún ingrediente funcional que presente un impacto positivo para la salud puede suponer un avance en el campo de la alimentación [6, 7] y en el de la medicina, ya que se puede mejorar la calidad de vida y reducir el uso de fármacos. Entre los muchos ingredientes alimentarios de diferente origen y naturaleza que poseen propiedades biológicas, destacan los carbohidratos de diferente grado de polimerización. Tal es el caso de las pectinas, obtenidas, principalmente, a partir de subproductos de manzana y de cítricos, que pueden aumentar su potencial como ingredientes bioactivos tras ser modificadas mediante tratamientos químicos, enzimáticos o físicos [8-10]. Así, se ha descrito una serie de beneficios para la salud asociados a los oligosacáridos pécticos tales como sus propiedades prebióticas, anticancerígenas, inmunomoduladoras y anticolesterolémicas [9-12]. Todas estas

propiedades son más evidentes en la pectina de cítricos, puesto que posee una mayor proporción de materia seca (20-30%), que en la pectina de manzana (10-15%) [13].

España, con una producción de 3,7 millones de toneladas en el año 2014, es el séptimo país productor de naranjas en el mundo y el primero en Europa, destinándose alrededor de la mitad a la elaboración de zumo. Además, España ocupa la posición decimocuarta a nivel mundial y la octava a nivel europeo como país productor de manzanas, con 671.000 T/año [14, 15]. Esta producción anual implica la generación de cantidades notables de subproductos, concretamente, la proporción que representa las pieles y membranas de la naranja es de 62,5% frente a un 12,5% de la manzana. De cada uno de estos porcentajes, al año se transforma en torno a 490.000 T de subproductos de cítricos, mientras que en el caso de la manzana es cuatro veces inferior, con un total cercano a 120.000 T [14].

El creciente interés que existe actualmente hacia las pectinas y sus oligosacáridos derivados es debido no sólo a su presencia mayoritaria en subproductos generados por la industria hortofructícola o a las diferentes bioactividades que posee, sino también porque su composición está libre de gluten o lactosa, que son dos de los ingredientes responsables de las reacciones adversas a alimentos más frecuentes, considerándose así, un ingrediente ideal en la industria alimentaria [16]. Dada la problemática existente en torno a los subproductos procedentes de la industria hortofructícola, y la potencial capacidad que tienen para influir positivamente en la salud, es evidente la necesidad de obtener y modificar pectinas con el fin de promover sus diversas propiedades funcionales y conocer otras nuevas que ayuden a mejorar el estado de bienestar del consumidor actual.

1.2. Pectinas

1.2.1. Características estructurales

Las pectinas (Figura 1) son polisacáridos complejos que se encuentran en la pared celular de las plantas superiores [17]. Están compuestas por distintos elementos estructurales donde homogalacturonano (HG) y ramnogalacturonano I (RGI) constituyen la columna vertebral de la pectina junto con algunos azúcares frecuentes, mientras que el ramnogalacturonano II (RGII) representa complejas cadenas laterales unidas a HG [18].

El constituyente mayoritario de la pectina es HG (65%), el cual está formado por residuos de ácido galacturónico, unidos mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y cuyos grupos carboxilo están parcialmente metilesterificados en la posición 6 [10, 17]. Además, este dominio puede encontrarse acetilado en la posición 2 ó 3 dependiendo de la procedencia de la pectina [9].

En el caso de RGI (20-30%), la columna vertebral está integrada por repetidos disacáridos constituidos por ramnosa y ácido galacturónico que también puede encontrarse acetilado en la posición 2 ó 3 [19, 20]. En muchos casos, a través de los residuos de ramnosa se disponen las cadenas laterales, integradas por distintos azúcares neutros tales como galactosa y arabinosa [12].

El dominio menos predominante y, a la vez, más complejo de la pectina es el RGII (1-8%) [18, 20]. Este está compuesto por una cadena principal similar al HG que se encuentra asociada a una amplia variedad de azúcares, unos frecuentes como ramnosa, fucosa, xilosa o galactosa y otros poco comunes como apiosa, ácido acérico ó ácido 3-deoxi-mano-octulosónico (KDO) [10, 18, 19].

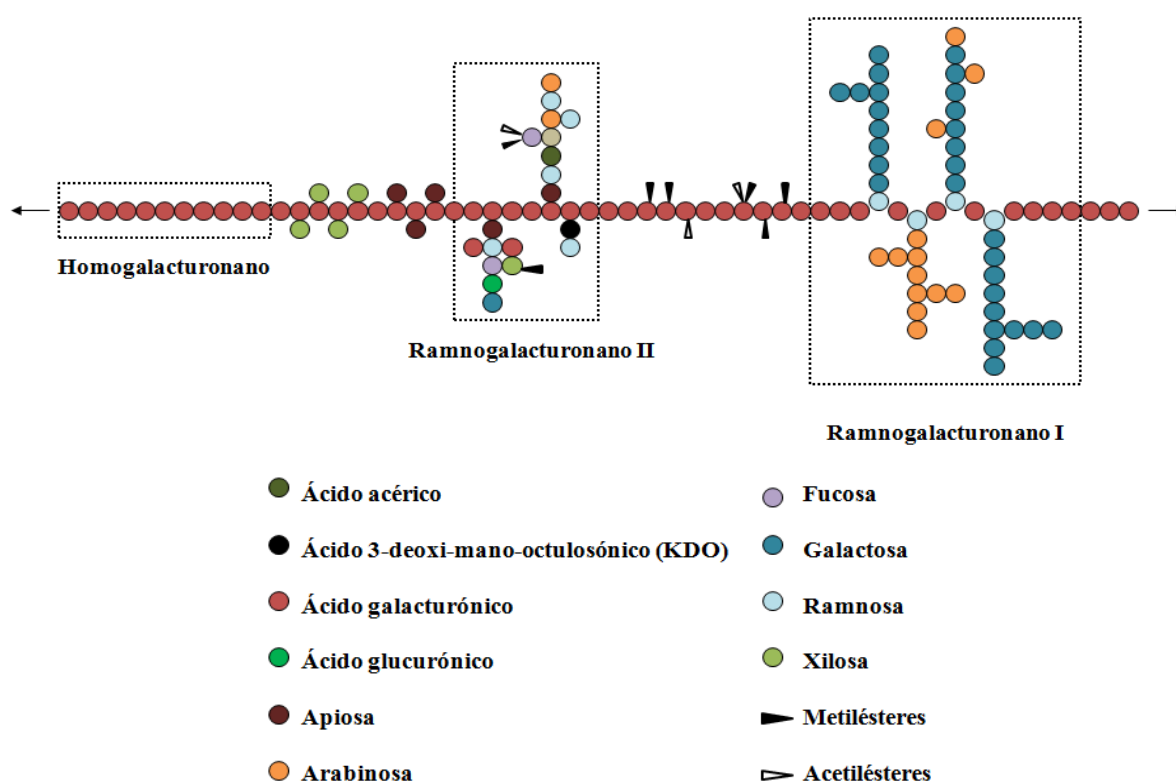


Figura 1. Estructura básica de la pectina. *Modificada de Willats y col. [19]*

La complejidad de la pectina se incrementa, ya que su estructura puede cambiar durante el almacenamiento de la planta y la obtención y procesamiento de este heteropolisacárido, modificando su funcionalidad y dificultando su elucidación estructural [20]. Existen evidencias que demuestran que las variaciones de las longitudes de las cadenas en cada uno de los dominios no son equitativas sino, que HG y RGII presentan una estructura altamente conservada, mientras que RGI exhibe una amplia heterogeneidad en su composición [21, 22].

Entre las pectinas comercializadas, el presente trabajo se ha basado en las más destacadas, es decir, las derivadas de subproductos de manzana y de cítricos, por mostrar un alto contenido en pectina y por el inmenso volumen de que se genera anualmente en nuestro país durante la elaboración de zumos [13, 20, 23, 24].

1.2.2. Propiedades tecnológicas y aplicaciones en la industria alimentaria

Las propiedades emulsificantes, texturizantes, espesantes y gelificantes de los ingredientes son determinantes para su uso desde el punto de vista tanto de la Tecnología de Alimentos como de la Medicina y la industria farmacéutica [20-26].

Para conseguir exhibir tan alentadoras propiedades es necesaria la caracterización física de un gel cuya formación es la consecuencia de una red tridimensional con moléculas de polímero reticuladas. A nivel molecular estos geles son resultantes de tres factores: la unión de moléculas de polímero mediante enlaces covalentes, la unión intermolecular de segmentos de polímeros que presentan una ligera movilidad debido a la combinación de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas y, por último, el agua retenida en la red del polímero [24].

Dos son los tipos de geles que han ganado popularidad debido a las diversas propiedades gelificantes y biológicas que se les atribuyen, los cuales se pueden obtener según el porcentaje de su grado de esterificación: bajo metoxilo (LM) cuando es inferior al 50% y de alto metoxilo (HM) en el caso de que sus grupos carboxilos esterificados representen más del 50% [23, 24]. Aunque ambos requieren la aproximación de las cadenas del heteropolisacárido para formar zonas de unión, los geles de las pectinas LM y HM son sintetizados de diferente manera. Así, los geles LM son originados tras la adición de cationes divalentes, tales como Ca^{2+} o Mg^{2+} , formándose zonas de unión regulares mediante enlaces intercatenarios. La síntesis de geles HM tiene lugar gracias a los enlaces de hidrógeno que se establecen entre los grupos carboxilo e hidroxilo de las cadenas adyacentes y, también, por las interacciones hidrofóbicas que se manifiestan entre los grupos metilésteres [24].

Las propiedades que facilitan la gelificación de la pectina, son la dispersabilidad, la capacidad de retención de agua, la solubilidad y la viscosidad. Cuando se disuelve pectina en polvo en agua, si no existe una fuerte agitación que la disperse, ésta tiende a retener rápidamente agua, concretamente entre 15 y 25 veces su peso, formando grumos. Estos grumos consisten en empaquetados de pectina semisecos contenidos en una envoltura donde el revestimiento exterior está altamente hidratado. Debido a que la solubilidad de los grumos es muy lenta se le añaden distintos azúcares con el fin de incrementar su solubilización [13, 24]. Generalmente, la solubilidad se incrementa con el aumento de la temperatura y con el número de grupos carboxilos esterificados. En cambio, disminuye a medida que asciende el pH, la concentración, la masa molecular (M_w) y en consecuencia, el grado de polimerización [24]. Sin embargo, el hecho de que la pectina sea soluble en agua no implica que la disolución resultante carezca de viscosidad, ya que para que se solubilice la pectina es necesario, principalmente, encontrarse en una concentración baja, mientras que la M_w de la pectina va ser el factor determinante para que ésta sea viscosa, independientemente de la

concentración en la que se encuentre [13]. Los geles LM destacan en la industria alimentaria y los HM adquieren protagonismo como excipientes en la industria farmacéutica aunque, en ocasiones, también se emplean en el campo de la alimentación [10]. Aunque las pectinas cuentan con un amplio abanico de propiedades farmacéuticas distintas y algunas de ellas se utilizan en algunas formulaciones, es en la industria alimentaria donde encuentran mayor número de aplicaciones, con un consumo estimado de 45.000 T/año [18].

La pectina es una de las protagonistas principales de la industria alimentaria no sólo por las propiedades emulsificantes, espesantes, texturizantes y gelificantes que exhiben en un amplio y variado número de alimentos, sino también por ser considerada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) como un aditivo (E-440) seguro [13, 21, 24]. Según el Reglamento (UE) N° 1129/2011, no hay establecidos límites de ingesta admisibles para las pectinas; sin embargo, este heteropolisacárido debe cumplir una serie de especificaciones establecidas por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO), tales como que el contenido de ácido galacturónico no puede ser inferior al 65% para ser utilizadas como aditivo alimentario [11].

En las mermeladas, lácteos, salsas y alimentos untables, la pectina LM se utiliza, principalmente, como agente espesante, gelificante y estabilizante [10, 19]. Sin embargo, su uso como aditivo alimentario está adquiriendo especial relevancia ante la elevada demanda de productos con bajo o nulo contenido en azúcar y grasa. Las pectinas LM son buenas sustitutas del azúcar y de la grasa, ya que mantienen la consistencia de partida en estas formulaciones [24, 25]. De esta manera, se cubre la necesidad de lanzar al mercado productos con bajo valor calórico, aptos para diabéticos y, también, para personas con alguna patología cardiovascular.

Las pectinas LM y HM también se emplean en muchos productos de panadería y pastelería [22]. Otras de las aplicaciones de las pectinas HM es su uso como recubrimientos y películas en alimentos como la mantequilla, el chocolate o los frutos secos, para inhibir la migración lipídica y mejorar sus propiedades sensoriales [22, 27]. Las jaleas que integran la masa en este tipo de alimentos están elaboradas con pectinas HM que, al ser térmicamente estables, refuerzan y mantienen la estructura del gel cuando el producto es sometido a temperaturas elevadas. El uso de pectina LM requiere una mayor cantidad de ésta en la fórmula para conseguir la misma firmeza, en comparación con los geles de pectina HM. En cambio, las jaleas a las que da lugar ofrecen un amplio y variado rango de acidez adaptándose a las exigencias de cada matriz alimentaria [13, 22].

En los alimentos congelados, la pectina LM, generalmente, favorece la textura controlando el tamaño de los cristales que hay presentes y previene la distribución heterogénea de las piezas de

fruta en productos como el yogur. En helados y polos la pectina reduce la tendencia del alimento a perder el color y sabor durante la congelación [22].

Los refrescos dietéticos son una de las bebidas del mercado cuya demanda se ha incrementado en los últimos años. En dichos refrescos, la reducción de la cantidad de sacarosa priva a la bebida de proporcionar al consumidor sensación alguna, por lo que se buscan alternativas. Este problema puede solventarse adicionando pectinas LM que son fácilmente dispersadas en estas formulaciones [28].

1.2.3. Propiedades biológicas y aplicaciones en la industria farmacéutica

La pectina es un polímero interesante para la elaboración de medicamentos puesto que es un heteropolisacárido natural e inocuo. Además, su papel como vehículo de distintos fármacos para su liberación controlada hacen de los geles de pectina HM unos excipientes prometedores en la industria farmacéutica [13, 28]. Sin embargo, la pectina no puede ser digerida ni incorporada al torrente sanguíneo debido a su elevada masa molecular (Mw) [21, 22]. De ahí la necesidad de despolimerizar pectinas mediante procesos químicos, físicos y enzimáticos, dando lugar a pequeños oligosacáridos que, tras ser absorbidos en el intestino delgado, puedan exhibir sus múltiples y potentes bioactividades [8-10].

Aunque existen algunos oligosacáridos prebióticos como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y lactulosa disponibles en el mercado, el creciente interés del consumidor hacia alimentos saludables que prevengan ciertas patologías ha promovido la producción sostenible de nuevos oligosacáridos con mejores propiedades que los carbohidratos de origen [9, 11, 12]. Tal es el caso de la pectina, que ha despertado un gran interés al emplearse como una fuente de oligosacáridos pécticos (POS). El potencial prebiótico de los POS se basa en su capacidad para aumentar selectivamente las poblaciones de algunas especies beneficiosas (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) y disminuir el desarrollo de bacterias potencialmente patógenas (*Clostridium*) en el tracto gastrointestinal, además de originar metabolitos beneficiosos para el huésped como lactato, ácidos grasos de cadena corta (SCFA) tales como acetato, propionato y butirato, y un menor pH [9, 11, 12, 29, 30]. Los SFCA están involucrados en la reducción del riesgo de desarrollar trastornos intestinales e incluso sistémicos [30]. Algunos estudios *in vitro* de la microbiota fecal de personas entre 24 y 30 años que no han tomado antibióticos en los seis meses previos al ensayo, han puesto de manifiesto el potencial prebiótico que implica la ingesta de los POS [9, 29, 30].

Otros beneficios terapéuticos atribuidos a las pectinas e importantes para diabéticos o pacientes con cardiopatías son la reducción significativa de las concentraciones de azúcar en sangre

y de los niveles de colesterol en plasma, especialmente el colesterol asociado con lipoproteínas de baja densidad (LDL) unido a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) [11, 13, 20, 24, 31]. El consumo de al menos 6 g/día de pectina es necesario para tener un efecto importante en los niveles de colesterol [22].

La pectina puede actuar como una sustancia natural profiláctica por su unión a cationes de metales tóxicos impidiendo que desarrollen su toxicidad. Su importancia reside en la eliminación de plomo, mercurio y cadmio en los órganos respiratorios y gastrointestinales de algunos empleados cuyo trabajo es desempeñado en áreas altamente contaminadas [11, 13, 24]. Además, un nutraceutico enriquecido en ácido galacturónico como el Pectasol[®] puede ser eficaz en la destoxificación de metales pesados [9]. Cuando se inyecta por vía intravenosa, la pectina acorta el tiempo de coagulación de la sangre extraída, siendo por tanto útiles en el control de hemorragias o sangrado local. El sulfato de pectina prolonga el tiempo de coagulación, por lo que puede ser un análogo de la heparina si no fuera porque es tóxico, lo que limita su uso a largo plazo y en dosis altas [13].

La tasa de digestión se reduce por acción de la pectina mediante la inmovilización de componentes alimentarios en el intestino [11]. Así, se impide el contacto entre las enzimas intestinales y los alimentos y se da una menor absorción, reduciendo así la biodisponibilidad de los ingredientes alimentarios [20]. Debido a su gran capacidad de retención de agua, la pectina provoca sensación de saciedad, disminuyendo así el consumo de alimentos. Muchos experimentos demuestran la prolongación del vaciado gástrico en un tiempo que varía entre 25 y 50 minutos cuando se consume un alimento fortificado con pectina [23]. En el caso de propiedades gastrointestinales, la pectina se utiliza ampliamente para curar diarreas, especialmente en bebés y niños. Una mezcla de pectina LM, $\text{Al}(\text{OH})_3$ y MgO ha ofrecido resultados prometedores para el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales. Con el fin de minimizar la irritación gastrointestinal y de curar enfermedades como la colitis ulcerosa, carcinomas de colon o la enfermedad de Crohn, la pectina HM promueve la liberación controlada de medicamentos en el colon [13].

Una de las actividades biológicas más prometedoras de la pectina es su capacidad para prevenir y reducir la carcinogénesis. La pectina despolimerizada o modificada de cítricos, a diferencia de la pectina de manzana, inhibe la metástasis *in vitro* de células tumorales e induce la apoptosis de células cancerígenas debido a la unión que mantienen las galactosas contenidas en sus cadenas laterales con la proteína galectina-3. Este vínculo puede bloquear los efectos negativos de la galectina-3, tales como su capacidad para promover la adhesión de células tumorales y la migración para prevenir la apoptosis. No sólo las cadenas laterales ricas en galactosa tienen un papel fundamental en el cáncer, también el dominio HG puede contribuir a la actividad

anticancerígena de las pectinas [9, 11, 23, 31, 32]. Aunque los efectos anticancerígenos de las pectinas comienzan a ser descritos con relativa regularidad, lo cierto es que el mecanismo de inducción de la apoptosis no es conocido en profundidad. Su elucidación es compleja debido a la gran heterogeneidad estructural y a los diferentes cambios estructurales de la pectina resultantes de los numerosos métodos de modificación que se pueden emplear [33].

1.3. Métodos de despolimerización de polisacáridos

Como se sabe, los polisacáridos constituyen una fuente importante y valiosa de hidratos de carbono. Sin embargo, para que las múltiples propiedades que les caracterizan sean expuestas y aplicadas en la industria alimentaria y farmacéutica pueden requerir de su despolimerización parcial o completa para dar lugar a oligosacáridos. Actualmente, los métodos disponibles para la despolimerización de polisacáridos son los tratamientos químicos, enzimáticos y físicos [9, 10, 33].

Mediante los métodos químicos se obtiene un elevado rendimiento en la despolimerización, ligeramente superior al obtenido con métodos enzimáticos. No obstante, la aplicación de métodos de despolimerización químicos suele implicar que los polisacáridos estén sujetos a condiciones extremas durante largos tiempos, lo que supone un problema medioambiental y dificulta su aplicación puesto que sus propiedades reológicas y texturizantes se ven alteradas, lo que disminuye su valor añadido y encarece los procesos posteriores necesarios para eliminar cualquier traza de ácido o base del ingrediente [33].

La despolimerización química de la pectina está catalizada por ácidos o bases que implican la eliminación de los grupos metoxilos, acetilos y otros grupos de los azúcares neutros. Sin embargo, las pectinas pueden escindirse por la cadena principal del polímero a través de la reacción de β -eliminación (Figura 2), cuando se encuentran en condiciones neutras, débilmente ácidas o básicas. Esta escisión sólo se puede producir en enlaces glicosídicos que tengan adyacente un ácido galacturónico esterificado. A mayor temperatura la velocidad de β -eliminación aumenta más que la desesterificación, desacetilación o la hidrólisis de los azúcares neutros situados en las cadenas laterales, mientras que un aumento de pH tiene el efecto inverso [21, 33].

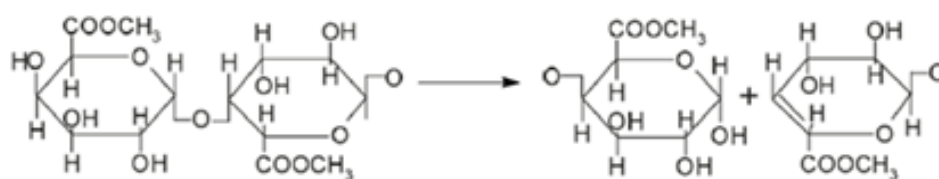


Figura 2. Reacción de β -eliminación entre moléculas de ácido galacturónico metoxilados. *Tomada de Chen y col. [33].*

Una despolimerización regioselectiva en condiciones suaves, eficaces y ecológicas, se puede obtener sin suponer un problema medioambiental mediante tratamientos enzimáticos [9, 10]. Sin embargo, dada la compleja estructura de los polímeros tipo pectina, estos tratamientos requieren el uso de diferentes tipos de pectinasas, enzimas capaces de hidrolizar a la pectina, aumentando su coste (Figura 3) [21, 34].

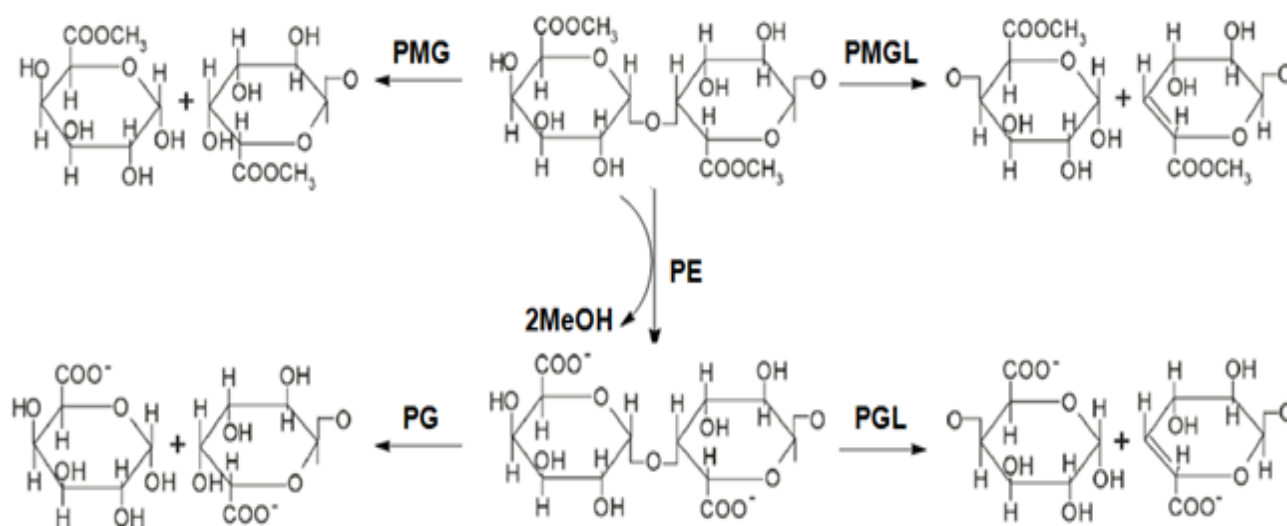


Figura 3. Esquema de la acción enzimática de las pectinasas. PMG=Polimetilgalacturonasa; PMGL=Polimetil-galacturonato liasa; PE=Pectinesterasa; PG=Poligalacturonasa; PGL=Poligalacturonato liasa. *Modificada de Alkorta y col. [34].*

La posibilidad de aplicar los métodos físicos como una alternativa en la reducción de la Mw, proporciona un enfoque atractivo por ser considerados ecológicos e innovadores, ya que pueden incrementar los rendimientos de los tratamientos, evitar reacciones secundarias no deseadas, ahorro de energía y tiempos de tratamiento más reducidos. No obstante, es difícil controlar la despolimerización de los compuestos y las propiedades reológicas y texturizantes se pueden ver alteradas dependiendo de la tecnología utilizada [10].

En este sentido, algunos tratamientos físicos tales como los ultrasonidos (US) de potencia, tratamientos de alta presión, radiación y la fotólisis también pueden inducir a la degradación de la pectina [33]. Los US es una tecnología emergente e innovadora que está ganando gran popularidad por ser económica, sencilla y permitir realizar tratamientos a temperaturas reducidas con un bajo consumo de energía. Por todo ello, constituyen una buena alternativa a los procesos convencionales [10, 21, 28].

1.4. Tratamientos por ultrasonidos

1.4.1. Fundamentos y aplicaciones

La tecnología de US se basa en la aplicación de ondas acústicas a una frecuencia por encima del umbral del oído humano (> 16 kHz). Estas ondas viajan a través del material por el que se propagan a una velocidad que depende de la naturaleza de la onda y del medio de propagación. Según el intervalo de frecuencias de oscilación que presenten se dividen en US de baja y alta intensidad: i) Los de baja potencia o intensidad tienen frecuencias entre 100 kHz y 1 MHz e intensidades menores de 1 W/cm^2 y se utilizan para análisis no destructivos de algunas propiedades físico-químicas de los componentes y productos alimentarios tales como firmeza, contenido de azúcar o acidez; ii) Los de alta potencia o intensidad presentan frecuencias entre 16 y 100 kHz e intensidades de $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$, lo cual puede inducir cambios físicos y químicos en las propiedades de los alimentos, siendo la cavitación el principal mecanismo (Figura 4) [10, 22, 25, 35].

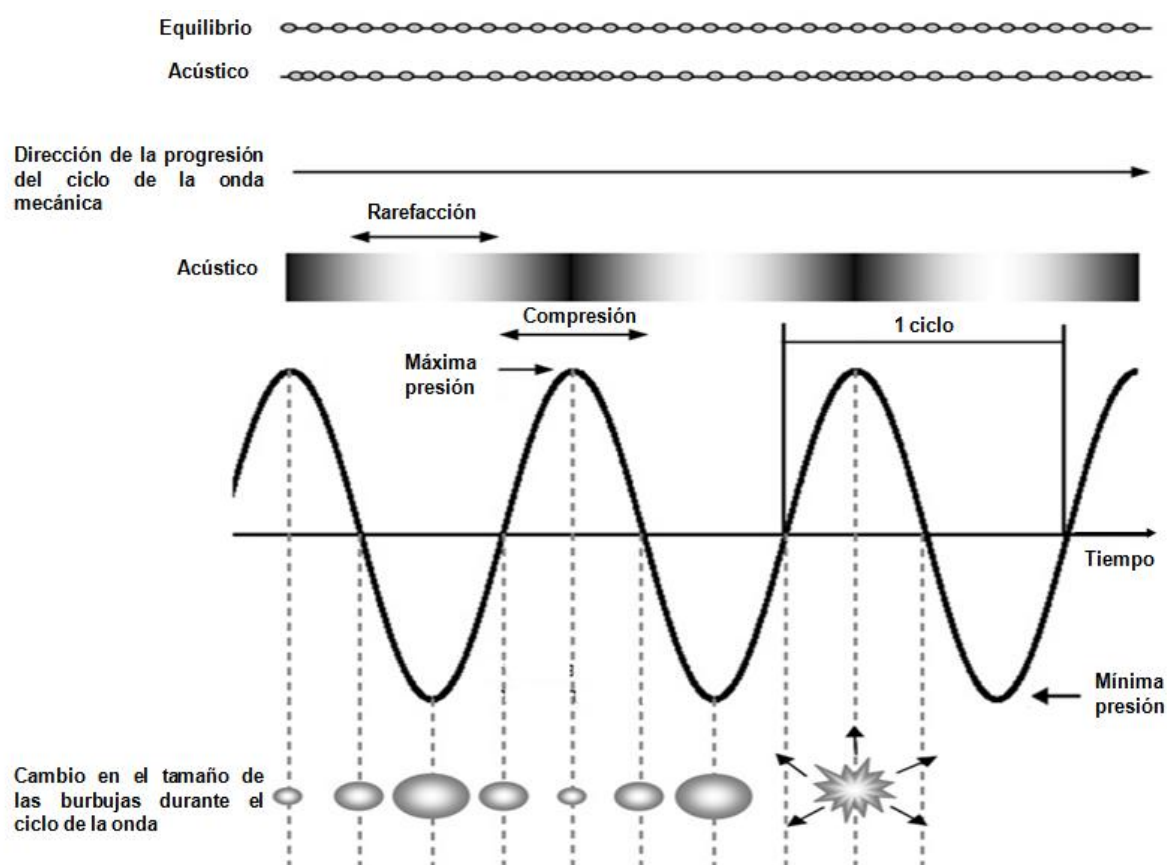


Figura 4. Esquema del fenómeno de cavitación. *Modificada de Soria y Villamiel [35].*

Los US se propagan por series de compresión y rarefacción a través del medio dando lugar al fenómeno de cavitación donde se originan burbujas que al aumentar de tamaño son inestables e implosionan violentamente de forma asimétrica. Este mecanismo puede producir fuertes efectos

físicos como las microcorrientes que consisten en la irrupción de fluido desde la burbuja hacia la superficie y que puede alterar las características del medio [22, 35, 36].

Además, las implosiones implican en cortos periodos de tiempo elevadas temperaturas (5000 K) y altas presiones (1000 atm). El efecto de los US se minimiza con temperaturas superiores a 60°C porque, aunque se puede producir un mayor número de burbujas, éstas son más pequeñas y al implosionar provocan una menor liberación de energía [36]. Por ello, los ensayos deben realizarse a temperaturas tan bajas como sea posible si se pretende obtener el máximo efecto de los US. Otro de los efectos a tener en cuenta es que, dependiendo de las condiciones de trabajo, parte de la energía ultrasónica puede absorberse en forma de calor, elevando la temperatura global de la muestra y disminuyendo el efecto de los US [35].

La cavitación podría inducir, también, la formación de radicales libres debido a la rotura de moléculas de agua que pueden reaccionar y modificar, a su vez, otras moléculas, si bien esto suele ocurrir de forma más evidente a valores elevados de frecuencias de oscilación [10, 35]. Aunque la formación de radicales libres puede ser más eficaz en los compuestos de baja Mw, los principales efectos de los US en alimentos están asociados con las fuerzas mecánicas que son más pronunciadas con el aumento de la Mw del compuesto. Generalmente, los efectos de los US aumentan con la intensidad aplicada, aunque esto sólo es válido hasta un cierto valor, ya que una gran cantidad de burbujas de cavitación pueden actuar como una barrera para la transmisión de energía en el sistema [10, 37].

Actualmente, los US pueden estar implicados en una gran variedad de procesos en distintas industrias. La capacidad que tienen para intensificar los procesos ha incrementado la popularidad de los US en la industria alimentaria y, con ello, se han estudiado diversas aplicaciones que incluyen la destrucción de microorganismos, inactivación de enzimas, producción y estabilización de emulsiones, ablandamiento de la carne así como su procesado, extracción, filtración y secado, entre otras [10, 23, 25, 35, 38]. Además, los US pueden facilitar la hidratación y el hinchamiento de los tejidos vegetales permitiendo altas velocidades de difusión a través de la pared celular y aumentando la transferencia de masa [39]. Tanto la cavitación como las microcorrientes pueden destruir estructuras superficiales como las paredes celulares facilitando la liberación de su contenido [39]. En la industria textil, los US también han adquirido cierta relevancia por su capacidad para modificar las propiedades morfológicas de materiales constituidos por polímeros sintéticos [24]. Los US también se han hecho un hueco en el medio ambiente, ya que sus principales papeles en este ámbito son la rehabilitación y tratamiento de lodos [39]. Sin embargo, una de las aplicaciones más prometedoras de los US podría ser la despolimerización de polisacáridos por las implicaciones que tienen sobre las propiedades de los compuestos bioactivos a los que podría dar lugar.

1.4.2. Los ultrasonidos como método de despolimerización

En línea con lo anterior, las industrias alimentaria y farmacéutica han sufrido una constante evolución tanto en el procesado de alimentos como en la producción de nuevas formulaciones en respuesta a los cambios en los gustos de los consumidores y a la repercusión negativa de muchas enfermedades, respectivamente. Además, el empeño de estas industrias por preservar y mejorar, en la medida de lo posible, la funcionalidad de los alimentos y la calidad de vida de muchos pacientes, ha estimulado la búsqueda de nuevas estrategias de obtención de ingredientes funcionales con base en carbohidratos entre las que destaca la despolimerización de polisacáridos mediante US.

La despolimerización por US puede producirse en respuesta a la concentración de grandes cantidades de energía en múltiples puntos del medio como resultado de diferentes efectos: i) la cavitación (20-100 kHz) que induce la degradación mecánica durante el colapso de las burbujas que producen elevadas temperaturas y presiones [39]; y ii) degradación química debido al efecto de los radicales hidroxilo (100-2000 kHz), siendo el primero el más habitual [22, 36, 40].

Como consecuencia de la degradación del polisacárido, sus propiedades tecnológicas y funcionales se pueden modificar de una manera diferente, dependiendo de las condiciones de procesado. Generalmente, la despolimerización a oligosacáridos aumenta con el tiempo prolongado del tratamiento por US y se ha demostrado que la polidispersidad disminuye con el tiempo del tratamiento que es directamente proporcional a la reducción de Mw [10, 40]. Algunos estudios revelan un mayor rendimiento en la despolimerización de polisacáridos cuando el tratamiento US se realiza en modo pulsado en lugar de en modo continuo [41, 42]. Además, la aplicación de intensidades crecientes de los US ocasiona una mayor reducción de Mw [10] hasta que se alcanza un determinado valor donde se producen un exceso de burbujas de cavitación que puede actuar como barrera en la transmisión de energía en el sistema. Otros factores que influyen en la degradación de polisacáridos por US son la frecuencia y la temperatura de tratamiento y el tipo, masa molecular y concentración del polisacárido a tratar [10, 35].

En lo que se refiere a pectinas, hasta nuestro conocimiento, los trabajos que han relacionado los cambios estructurales originados por US con las propiedades de estos heteropolisacáridos son muy escasos. Zhang y col. [22, 23] despolimerizaron pectina de manzana y de cítricos mediante la optimización de las intensidades y temperaturas aplicadas en US en medio acuoso. Además, Zhang y col. [21] estudió el efecto que tienen los US en combinación con ácidos a temperaturas y tiempos extremos en la estructura de la pectina de cítricos. Hasta el momento, no se han encontrado estudios que relacionen la despolimerización de la pectina con su estructura y propiedades funcionales.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La gestión de un volumen importante de subproductos generados en la industria hortofrutícola supone una preocupación constante, además de un problema económico y medioambiental. Estos subproductos podrían ser fuentes adecuadas para la obtención de nuevos ingredientes alimentarios que destaquen por su alto valor añadido permitiendo, además, su revalorización sostenible. Por otro lado, debido al aumento de la incidencia de algunas enfermedades y la ingesta excesiva de calorías, es indispensable promover hábitos de vida saludables que eviten, en la medida de lo posible, el desarrollo de patologías crónicas de cierta gravedad. Por todo ello, conseguir mejores alimentos enriquecidos con algún compuesto bioactivo que tenga un impacto positivo en la salud podría reducir el uso de fármacos y suponer un avance en el campo de la alimentación. Tal es el caso de las pectinas, obtenidas a partir de subproductos de cítricos y de manzana, ampliamente utilizadas hasta ahora a nivel tecnológico, que podrían exhibir su potencial como ingredientes bioactivos tras ser transformadas en oligosacáridos mediante el tratamiento con US de potencia.

En este sentido, el objetivo del presente Trabajo Fin de Máster es estudiar el efecto de los ultrasonidos de potencia en la despolimerización de pectinas procedentes de subproductos de la industria hortofrutícola y en su actividad antioxidante, con el fin de disponer de ingredientes alimentarios con propiedades que mejoren la funcionalidad de los alimentos, revalorizando, así, la materia prima de partida.

Según los antecedentes previamente expuestos y con el fin de alcanzar el objetivo planteado, se ha seguido el siguiente plan de trabajo, presentado de forma esquemática en la Figura 5:

1. Puesta a punto de la metodología necesaria para la despolimerización de pectinas empleando ultrasonidos de sonda y ultrasonidos en baño.
2. Purificación de las pectinas de alta masa molecular procedentes de manzana y de cítricos.
3. Caracterización físico-química de la materia prima de partida y de las fracciones purificadas.
4. Tratamiento de las pectinas purificadas mediante ultrasonidos en presencia de agua o ácidos.
5. Evaluación del efecto de los ultrasonidos en medio acuoso y en medio ácido sobre la estructura de las pectinas, incluyendo el grado de polimerización.
6. Estudio del efecto de los ultrasonidos en la actividad antioxidante de las pectinas.

Figura 5. Plan de trabajo llevado a cabo en la presente memoria. AA (Actividad Antioxidante); Aw (Actividad del agua); PCP (Pectina Cítricos Purificada); PMP (Pectina Manzana Purificada); SEC (Cromatografía de Exclusión Molecular); FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier); US (Ultrasonidos).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y muestras

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado los siguientes reactivos suministrados por la firma Sigma-Aldrich: tetraborato sódico, trolox, ácido 3,5-dinitrosalicílico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, m-hidroxidifenil y patrones de ácido galacturónico, glucosa, galactosa, fucosa, fructosa, sacarosa. El tartrato de sodio fue proporcionado por Emsure. La manosa, ramnosa y xilosa se adquirieron a través de Merck. Los patrones de pululanos (Pullulan Standart Set) fueron suministrados por la marca Fluka y, por último, el ácido glucurónico y el cloruro de sodio fueron proporcionados por Panreac.

En cuanto a las muestras, el producto comercial de la pectina de cítricos se obtuvo en Acofarma la cual, atendiendo a las indicaciones del fabricante, tiene un peso molecular estimado entre 20.000 y 400.000 Da, mientras que la pectina de manzana fue suministrada por Sigma-Aldrich y, de acuerdo a su correspondiente ficha de información técnica, el peso molecular estimado puede variar desde 30.000 hasta 100.000 Da.

3.2. Purificación de la materia prima

3.2.1. Pectina de manzana

La pectina de manzana se purificó por precipitación con etanol, tal y como lo describe Zhang y col. [23]. La pectina se disolvió en agua Milli-Q (50 g/L) con agitación vigorosa durante 30 min. Se añadieron tres volúmenes de 95 mL de etanol al 96% a la disolución y, a continuación, se filtró a vacío con un embudo Büchner. Tanto el residuo como su correspondiente agua de lavado se liofilizaron (Figura 6) en un equipo Telstar Lyobeta-15. Las fracciones liofilizadas se molieron en un molino de cuchillas (Retsch GM 200 Grindomix) y, más tarde, se almacenaron a -20°C protegidas de la humedad con sílica gel.



Figura 6. Pectina de manzana purificada (izquierda) y aguas de lavado tras la purificación (derecha).

3.2.2. Pectina de cítricos

La pectina de cítricos se disolvió en agua Milli-Q (7 g/L) con agitación vigorosa durante 45 min. A continuación, se adicionaron a la disolución tres volúmenes de 200 mL de etanol al 96% y, tras formarse el precipitado, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min en una centrífuga Thermo Evolution RC. A continuación, se retiró el sobrenadante que, posteriormente, se filtró a vacío en un embudo Büchner a través de un filtro de celulosa. Por otro lado, el residuo se evaporó en rotavapor a 35°C. Ambas fracciones se liofilizaron en un equipo Telstar Lyobeta-15 (Figura 7) y se molieron en un molino de cuchillas (Retsch GM 200 Grindomix). Finalmente, se almacenaron hasta su uso a -20°C en presencia de sílica gel.



Figura 7. Pectina de cítricos purificada (izquierda) y aguas de lavado tras la purificación (derecha).

Finalmente, las pectinas comerciales de manzana y cítricos (PMC y PCC), purificadas (PMP y PCP) y sus correspondientes aguas de lavado se analizaron mediante SEC con el fin de conocer qué se había eliminado de las pectinas de partida tras la purificación.

Las distintas fracciones se prepararon a una concentración de 5 mg/mL en la propia fase móvil, NaCl 0,1 M. De las muestras se tomó 1 mL para su posterior filtración empleando filtros de PVDF de 0,20 μ m de tamaño de poro.

La estimación de la M_w se llevó a cabo en un equipo de LC Agilent Technologies 1220 Infinity LC System 1260 con un detector de índice de refracción (Boeblingen, Alemania) utilizando una columna TSKgel G5000 PWXL de dimensiones 7,8 mm x 30 cm (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania). Todas las determinaciones se llevaron a cabo a 25 °C y a un flujo de 0,5 mL/min.

3.3. Puesta a punto de los equipos de US

Dado que uno de los parámetros más influyentes en el efecto de los tratamientos por US es la potencia, fue preciso calcular dicho parámetro tanto en los ensayos con sonda de US como en los de baño de US. Se calculó la potencia real (P) para cada uno de los tiempos y temperaturas alcanzadas obtenidos en las distintas condiciones de operación, tal y como recoge Karaman y col. [39].

$$P = m C_p \frac{dT}{dt}$$

Donde dT/dt es el cambio de temperatura con respecto al tiempo ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$), C_p es el calor específico del agua ($\text{J kg}^{-1} \text{C s}^{-1}$) y m es la masa (kg).

3.3.1. Con baño de ultrasonidos

Se empleó un baño de US (Sonica Sweep System EP 2200 Soltec) a una frecuencia de 45 kHz, provisto de una estructura metálica para sostener los 50 mL de agua Milli-Q contenidos en vasos de precipitados de 100 mL. Se realizaron dos tipos de tratamiento: en modo continuo y en modo pulsado, monitorizando la temperatura a intervalos de tiempo de 0, 200, 400, 600 y 800 s. El nivel de agua del baño de US se controló de forma que durante todo el tratamiento cubriera la muestra.

3.3.2. Con sonda de ultrasonidos

Se utilizó un sonicador Branson Digital Sonifier 450 provisto de sensor de temperatura integrado y control digital de amplitud de onda, tiempo y temperatura, a una frecuencia de operación de 20 kHz. La sonda de US de 12,7 mm (Biogen Científica S.L.) se sumergió en 50 mL de agua Milli-Q dispuesta en vasos de precipitados de 100 mL, a una profundidad de 2 cm del nivel de la muestra. Se registró la temperatura alcanzada a los tiempos 0, 200, 400, 600 y 800 s operando en modo continuo y pulsado (ON 1 s/ OFF 1 s y ON 2 s/ OFF 1 s) siendo 30, 50 y 70% los valores de amplitud seleccionados.

3.4. Tratamientos de despolimerización de pectinas

Los tratamientos se llevaron a cabo con las pectinas purificadas tanto de manzana como de cítricos según lo indicado en el esquema de la Figura 5.

3.4.1. Con ácidos

Las muestras de pectina disueltas (0,5%) en tres ácidos distintos (HCl , HNO_3 y H_2SO_4) de concentración 0.1 N se mantuvieron en agitación a 750 rpm y 50°C durante 1 h en un Thermomixer comfort eppendorf usando un cabezal Eppendorf con una capacidad de 50 mL.

3.4.2. Con baño de ultrasonidos

Las muestras de pectina (50 mL) disueltas en agua al 0.5% se sometieron a tratamientos en el baño de US previamente indicado a una frecuencia de 45 kHz. Se realizaron dos tipos de tratamientos: en modo continuo y en modo pulsado tomando la temperatura cada 10 min durante 1 h. El nivel de agua del baño de US se controló de forma que durante todo el tratamiento cubriera la muestra.

3.4.3. Con sonda de ultrasonidos

Se utilizaron dos sonicadores de diferente potencia: un Branson Digital Sonifier 450 y otro con la mitad de potencia aproximadamente, un Branson Digital Sonifier 250. Ambos provistos de un sensor de temperatura integrado y control digital de amplitud de onda, tiempo y temperatura, a una frecuencia de operación de 20 kHz. Para cada uno de los dos sonicadores se utilizaron dos sondas de US (Figura 8): una de diámetro grande (12,7 mm, Biogen Científica S.L.) y otra pequeña (3 mm, Biogen Científica, S.L.). La sonda grande en los dos sonicadores se sumergió en 50 mL de muestra dispuesta en vasos de precipitados de 100 mL, a una profundidad de 2 cm del nivel de la muestra. En cambio, la sonda pequeña se sumergió en 30 mL de muestra en un tubo Falcon de 50 mL a 1 cm por encima del fondo del tubo. Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado.



Figura 8. Sonicador de 250 W y sondas utilizadas. Izquierda: sonda de 3 mm. Derecha: sonda de 12,7 mm.

Con el fin de facilitar la comprensión de los ensayos realizados con sonda de US se muestra la Tabla 1 con los tratamientos realizados:

Tabla 1. Sonificadores, sondas y condiciones utilizadas para las muestras PMP y PCP.

	SONICADOR 250 W		SONICADOR 450 W	
	Sonda 12,7 mm	Sonda 3 mm	Sonda 12,7 mm	Sonda 3 mm
PMP (0,5%)	Modo pulsado: (ON 2 s/ OFF 1 s)	Modo pulsado: (ON 2 s/ OFF 1 s)	Modo pulsado: (ON 2 s/ OFF 1 s)	Modo pulsado: (ON 2 s/ OFF 1 s)
	A= 70%	A= 30%	A= 30, 50, 70%	A= 30%
	t= 0, 30 y 60 min	t= 0, 30 y 60 min	t= 0, 200, 400 y 800s	t= 0, 30 y 60 min
	T constante= 45°C	T constante= 45°C	T no constante	T constante= 45°C
PCP (0,5%)		Modo pulsado: (ON 2 s/ OFF 1 s)		Modo pulsado: (ON 2 s/ OFF 1 s)
		A= 30%		A= 30%
		t= 0, 30 y 60 min		t= 0, 30 y 60 min
		T constante= 45°C		T constante= 45°C

3.4.4. Con ácidos y sonda de ultrasonidos

Se emplearon los dos sonificadores descritos en el apartado 3.4.3. La sonda de US de 3 mm, se sumergió en un tubo Falcon de 50 mL a 1 cm por encima del fondo del Falcon que contenía las muestras de PMP disueltas al 0,5% en HNO_3 0,1 N. Para evitar un aumento excesivo de la temperatura ($\geq 45^\circ\text{C}$) se empleó un baño de agua-hielo. Se operó de modo pulsado (ON 2 s / OFF 1 s) siendo 30% la amplitud seleccionada.

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Determinación del pH, actividad del agua (A_w) y extracto seco

Las determinaciones de pH se realizaron a 25°C utilizando un pH-metro Mettler Toledo equipado con un electrodo de referencia Mettler (Toledo, InLab[®] 420). Para cada una de las pectinas se preparó una disolución al 2% (p/v) con agua Milli-Q y se midió en pH por duplicado.

La A_w se determinó en un aparato Novasina (A_w Sprint Th 500) con control de temperatura. Previamente, se realizó una calibración del equipo con patrones de humedad controlada, correspondientes a disoluciones acuosas saturadas de distintas sales inorgánicas (LiCl , MgCl_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NaCl , BaCl_2 y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). La ecuación de la recta de calibrado fue $y = 0,9925x + 0,008$ con un coeficiente de correlación de 0,999. Una alícuota de cada una de las pectinas se colocó en cápsulas de polipropileno de 40 mm de diámetro y 12 mm de profundidad completando 2/3 de su capacidad y se introdujo en el interior de la celda. Las muestras se analizaron por duplicado a 25°C de temperatura. El extracto seco de las muestras, tanto de la pectina de manzana como de la pectina de cítricos, se determinó pesando exactamente 0,2 g y llevándolas a sequedad a 102°C en una estufa hasta peso constante (3 d). Esta determinación se llevó a cabo por triplicado.

3.5.2. Análisis de minerales

La composición de minerales de las pectinas comerciales de manzana (PMC) y la pectina de cítricos (PCC), se determinó en un instrumento ICP-MS Elan 6000 Perkin-Elmer Sciex del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI-UAM) de Madrid. Se llevó a cabo tanto un análisis semicuantitativo como un análisis cuantitativo de los elementos de interés, utilizando el método de calibración externa y estándares internos para corregir la deriva instrumental [44].

3.5.3. Determinación de la composición monomérica

Para la determinación de los monosacáridos neutros y disacáridos fue necesaria una hidrólisis ácida previa de las pectinas las cuales se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención con los correspondientes de patrones de azúcares, tras su análisis por HPAEC-PAD, tal y como lo describe Garna y col. [45] con alguna modificación. La hidrólisis ácida se realizó disolviendo las pectinas purificadas de manzana y de cítricos en ácido trifluoroacético (TFA) 2 M a una concentración de 5 mg/mL, y se mantuvieron durante 4 h a 120 °C. Posteriormente, se comprobó la posible evaporación del TFA durante la incubación de las muestras pécticas, en cuyo caso se adicionó el volumen de ácido evaporado. Las fracciones de la pectina de manzana y de cítricos resultantes se evaporaron en rotavapor y se disolvieron en agua Milli-Q al 0,5%. De las disoluciones resultantes se tomó 1 mL que se filtró con filtros de PVDF de 0,20 µm de tamaño de poro analizándose junto a los patrones (5 mg/mL) de glucosa, galactosa, fructosa, fucosa, manosa, ácido galacturónico, ramnosa, xilosa, ácido glucurónico y sacarosa, en un Dionex provisto de un detector ED50 Electrochemical, una columna CarboPac PA-1 (50 x 4 mm) y una precolumna CarboPac-1. Todas las determinaciones se llevaron a cabo a 25 °C y a un flujo de 1 mL/min. Se inyectaron 20 µL y la elución se realizó en gradiente, empleando tres eluyentes: A (100 mM NaOH), B (100 mM NaOH y 50 mM NaOAc) y C (100 mM NaOH y 1 M NaOAc). El gradiente empleado fue: 0-20 min (100% A), 20-70 min (100% B), 70-80 min (100% C), 80-81 min (100% A) y 81-95 min (100% A). Además, el programa del detector constó de cuatro intervalos: 0-0,4 s (0,1 V), 0,4-0,42 s (-2,0 V), 0,43 s (0,6 V), 0,4-0,5 s (-0,1 V). Finalmente, la adquisición y procesamiento de datos se llevaron a cabo mediante el *software* Chromeleon 6.7.

El contenido de ácido galacturónico total de la pectina de manzana y de la de cítricos se cuantificó empleando un espectrofotómetro provisto de un lector de placas (Lector KcJunior Biotek) siguiendo el método descrito por Blumenkrantz y col. [43]. En primer lugar, se realizó una recta de calibrado a partir de disoluciones seriadas de ácido galacturónico de concentraciones desde 10 µg/mL a 5000 µg/mL en agua Milli-Q. Posteriormente, se adicionaron 20 µL de cada patrón de concentración conocida y 1,2 mL de tetraborato sódico 0,0125 M preparado en ácido sulfúrico al 95

%. Puesto que cada patrón necesita su blanco se repitió el mismo proceso pero sustituyendo el tetraborato sódico 0,0125 M por el mismo volumen de NaOH (0,5%) en agua Milli-Q. Cada uno de los eppendorf pertenecientes a los patrones y sus correspondientes blancos se introdujeron en hielo y a continuación se agitaron en un vórtex. Tras ser agitados, se mantuvieron 5 min a ebullición para parar la reacción y se enfriaron. Tanto a los patrones como a cada uno de los blancos se les adicionaron 20 μL de 0,15 % de m-hidroxidifenil preparado en 0,5% NaOH mantenido en refrigeración y protegido de la luz. A continuación, todos los eppendorf se agitaron en un vórtex. Debido a que el m-hidroxidifenil es inestable incluso en refrigeración y protegido de la luz, la recta de calibrado de este azúcar se repitió cada vez que se realizó el ensayo. Finalmente, se tomaron 300 μL de cada eppendorf y se añadieron por triplicado a una microplaca de 96 pocillos que se leyó a 520 nm. Los valores de R^2 correspondientes a las distintas rectas de calibrado elaboradas se encontraban en torno a 0,99. La presencia de ácido galacturónico se tradujo en una coloración rosa. Una mayor intensidad de color corresponde a una mayor concentración de ácido galacturónico. Las muestras y sus blancos correspondientes se realizaron siguiendo el procedimiento utilizado para la elaboración de la recta de calibrado del ácido galacturónico donde los 20 μL que correspondían a cada patrón, son sustituidos por las muestras de pectinas comerciales y purificadas.

Las determinaciones anteriores se realizaron tanto en PMC y PCC como PMP y PCP.

3.5.4. Estimación del grado de esterificación (DE) mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los análisis se realizaron en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la UAM, utilizando el espectrómetro FTIR Bruker IFS66v. Se pesaron 0,5 mg de cada muestra y se preparó una pastilla de KBr. Las medidas en transmisión tuvieron un intervalo espectral de 7000-550 cm^{-1} (IR medio), una resolución de 4 cm^{-1} y una apertura de 1,0 mm.

El grado de esterificación (DE) se calculó siguiendo el método descrito por Zhang y col. [21] y Singthong y col. [46], y se basó en el cociente del área de la banda 1743 cm^{-1} (COO-R) y la suma de las áreas de las bandas 1747 cm^{-1} (COO-R) y 1632 cm^{-1} (COO⁻).

3.5.5. Estimación y distribución de la masa molecular (Mw) mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC)

Las diferentes muestras de las pectinas de manzana y cítricos sometidas a cualquier tratamiento de despolimerización indicado se analizaron mediante SEC. De las fracciones tratadas se tomó 1 mL para su posterior filtración empleando filtros de PVDF de 0,20 μm de tamaño de poro. La estimación de la masa molecular se llevó a cabo en un equipo de LC Agilent Technologies 1220 Infinity LC System 1260 con un detector de índice de refracción (Boeblingen, Alemania)

utilizando una columna TSKgel G5000 PWXL de dimensiones 7,8 mm x 30 cm (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania). Se utilizó como fase móvil NaCl 0,1 M a un flujo de 0,5 mL/min. La adquisición y el procesamiento de datos se llevaron a cabo utilizando el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Boeblingen, Alemania).

Para la estimación de la Mw se construyó una recta de calibrado siendo y el logaritmo de Mw y el volumen de elución la x . Se empleó una mezcla de patrones de pululanos de 788.000, 473.000, 212.000, 100.000 y 1.320 Da a una concentración de 5 mg/mL. La recta de calibrado obtenida con la ecuación correspondiente se muestra en la Figura 9.

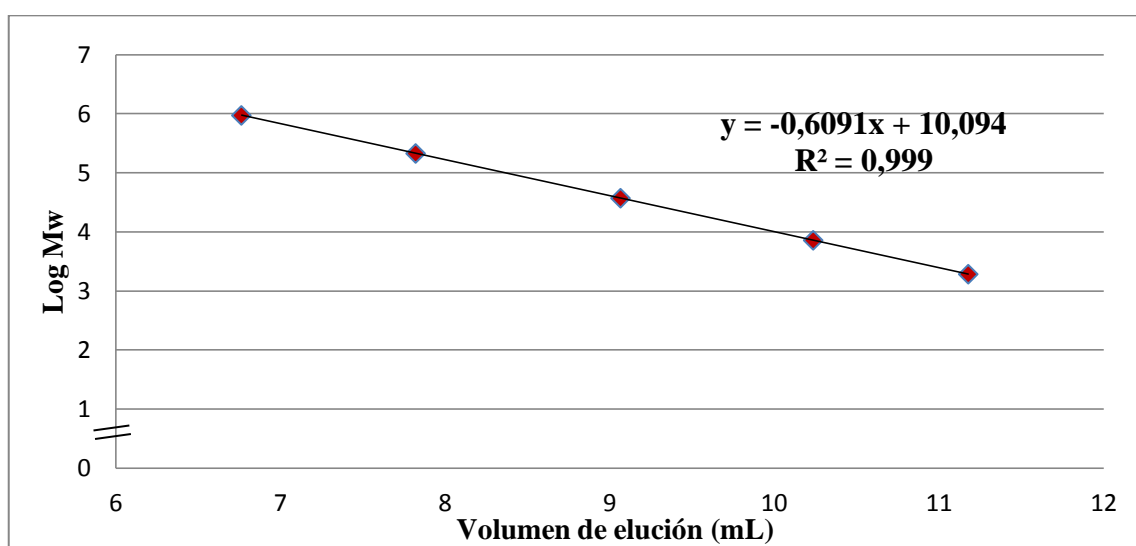


Figura 9. Curva de calibrado empleada para estimar la Mw de las pectinas.

3.5.6. Determinación del poder reductor mediante ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)

Como consecuencia de la despolimerización puede verse modificado el poder reductor de los polisacáridos. Así, la valoración del poder reductor de las pectinas de manzana y cítricos despolimerizadas se realizó mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Sumner y col. [47] cuyo fundamento se basa en la reducción de este ácido (color amarillo) por un azúcar reductor, pasando a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color rojo intenso) [47]. Su presencia se determinó empleando un espectrofotómetro provisto de lector de placas (Lector KcJunior Biotek). En primer lugar, se preparó el DNS a una concentración de 0,01 g/mL en agua Milli-Q calentada previamente y se le adicionaron 20 mL de NaOH 2 N bajo agitación. A continuación, se agregaron 30 g de tartrato de sodio y potasio (también llamada sal de Rochelle) junto con agua Milli-Q hasta alcanzar los 100 mL. Este tubo se mantuvo en refrigeración y protegido de la luz hasta su uso. Para la determinación del poder reductor se tomaron 100 μ L de las muestras tratadas y se adicionaron 100 μ L de DNS a un eppendorf que se agitó en un vórtex. Los eppendorfs se mantuvieron en un baño de agua en ebullición durante 5 min, para que la reacción se desarrollara. Posteriormente, las

muestras se enfriaron rápidamente en hielo para detener la reacción. Se adicionaron 750 μ L de agua Milli-Q y se transfirieron a una placa multipocillos para su lectura a 540 nm. En todos los casos se prepararon sus respectivos controles en las mismas condiciones. Para la estimación del poder reductor de las diferentes muestras de pectinas se construyó, previamente, una recta de calibrado a partir de una serie de disoluciones de ácido galacturónico que presentaron concentraciones entre 0-5 mM en agua. La recta obtenida fue $y = 0,1995x + 0,038$ con un coeficiente de correlación de 0,999.

3.5.7. Determinación de la turbidez

Con el fin de conocer si la turbidez decrece cuanto mayor es la despolimerización de la pectina, se midió la turbidez en todas las muestras controles y en las tratadas por US. Este ensayo se realizó siguiendo el método descrito por Seshadri y col. [25]. 300 μ L de las soluciones acuosas de las muestras de pectina que fueron tratadas con US se adicionaron a una microplaca de 96 pocillos que se leyó a 480 nm empleando un espectrofotómetro provisto de un lector de placas (Lector KcJunior Biotek).

3.5.8. Determinación de la actividad antioxidante (AA)

La medida de la AA tanto de los controles como de las muestras tratadas se realizó mediante el método del DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) empleando el espectrofotómetro indicado anteriormente provisto de lector de placas y a una longitud de onda de 517 nm [48]. El DPPH se preparó a una concentración de 2 mM en etanol. A 7 μ L de cada control o muestra se le adicionaron 193 μ L de una dilución 1:15 de DPPH 2 mM. Una vez mezcladas las disoluciones se dejaron a temperatura ambiente en una microplaca de 96 pocillos protegida de la luz. Transcurridos 30 min apareció una coloración morada y se midió la absorbancia a 517 nm. Para la estimación de la AA se construyó, previamente, una recta de calibrado a partir de una serie de disoluciones de trolox con concentraciones entre 0,25-2,5 mM en metanol. La ecuación de la recta de calibrado de trolox fue $y = -0,1753x + 0,614$ con un coeficiente de correlación de la recta de 0,999. Una mayor actividad antioxidante en las muestras se correspondía con una mayor disminución de la absorbancia inicial del reactivo DPPH. Los análisis se realizaron por triplicado.

3.5.9. Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) empleando el programa Statgraphics Plus 5.1. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Purificación de la materia prima

Los rendimientos estimados obtenidos en las sucesivas purificaciones de las pectinas fueron del 95 % en el caso de las pectinas procedentes de manzana y del 76 % en la pectina de cítricos. Con este proceso se eliminan principalmente compuestos de bajo peso molecular.

A la vista de la Figura 10, se observa en el caso de la PMC un pico entre 20 y 30 min que corresponde a una distribución de compuestos de alta Mw y un pico entre 39 y 42 min que se refiere a las sales. Tras la purificación, en la PMP se aprecia una ligera disminución del área del primer pico eluido y una reducción elevada en el segundo pico. Por otro lado, en las aguas de lavado existen varios picos situados entre 35 y 40 min que podrían ser algunos monosacáridos que han sido eliminados de la PMC por la zona del cromatograma en el que eluyen.

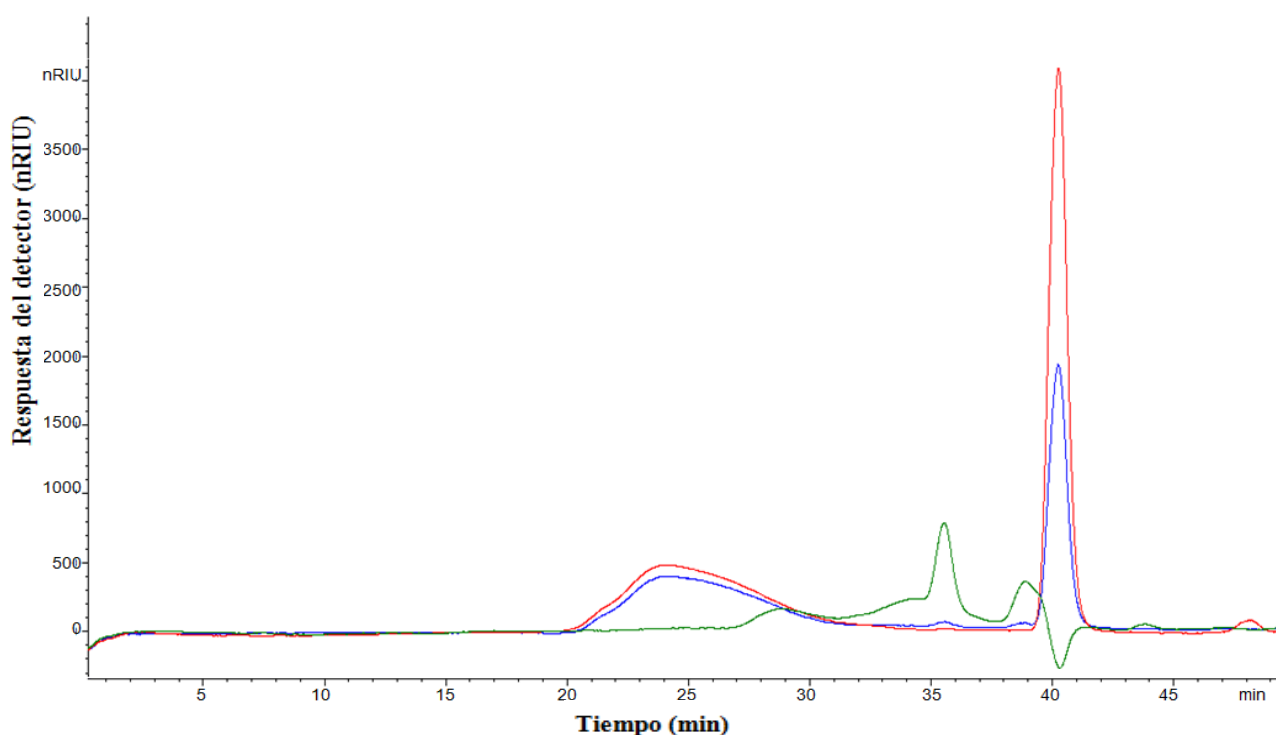


Figura 10. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la PMC (rojo), PMP (azul) y las correspondientes aguas de lavado (verde).

En la Figura 11, a diferencia de lo que ocurría en la pectina de manzana, es evidente una mayor reducción del primer pico de la PCP situado entre 25 y 30 min en comparación con la PCC. Este pico está vinculado con la distribución de diferentes especies de alta Mw y además, el frente indica la proximidad de alcanzar el volumen de exclusión de la columna cromatográfica. De la misma manera que en el caso de la pectina de manzana, el segundo pico eluido entre los 39 y 42 min correspondiente a sales disminuye considerablemente tras la purificación de la PCC. En cuanto a las aguas de lavado, hay un pico muy pequeño en la zona en la que se encuentran compuestos de

mayor M_w , ciertos azúcares entre 36 y 42 min, resultantes de la purificación y una pequeña cantidad de sales en comparación con las aguas de lavado de la pectina de manzana. Las diferencias cromatográficas encontradas entre las dos pectinas puede deberse a que han sido purificadas de diferente manera.

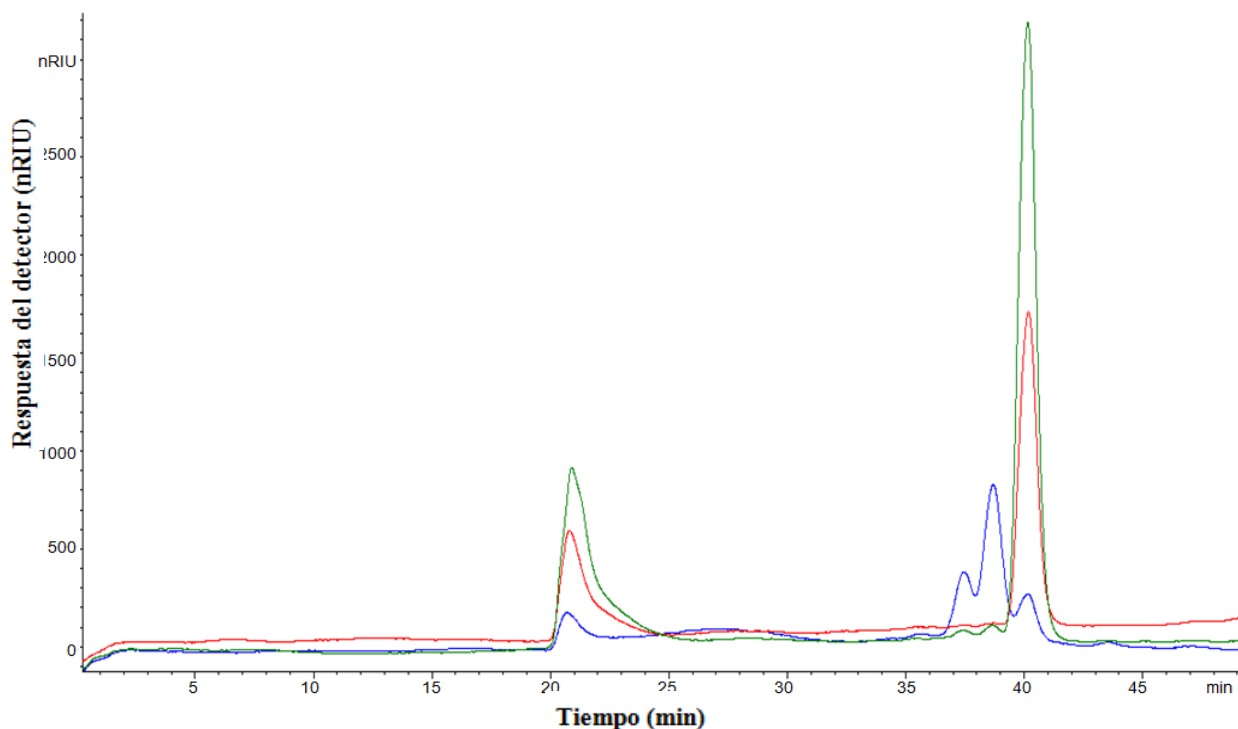


Figura 11. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la PCC (verde), PCP (rojo) y las correspondientes aguas de lavado (azul).

4.2. Caracterización físico-química

4.2.1. Determinación del pH, actividad del agua (A_w), extracto seco y ácido galacturónico

La importancia de caracterizar de forma físico-química las pectinas antes y después de ser purificadas se basa, por un lado, en el efecto que tiene el pH sobre las propiedades funcionales, y por otro lado, en la estabilidad microbiana que puedan ofrecer, en caso de ser aditivos alimentarios.

Así, la Tabla 2 muestra los resultados obtenidos para los diferentes parámetros estudiados. Como se puede observar, el pH en las cuatro pectinas fue ácido, sin embargo, las más ácidas fueron las derivadas de manzana. Es interesante destacar que el pH en la PMC (3,18) disminuye muy ligeramente tras ser purificada a PMP (3,03). A valores de pH inferiores a 3,5, los enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilos que se encuentran principalmente asociados y sin carga favorecen las fuertes interacciones entre las macromoléculas de pectina. Por el contrario, en la pectina de cítricos comercial (PCC) con un pH de 4,55 se incrementó su valor en 0,7 unidades tras su purificación (PCP). A valores de pH superiores a 4,5 los grupos carboxilos se encuentran disociados y cargados negativamente, provocando la repulsión electrostática entre macromoléculas

[49]. Por otra parte, en base a los resultados de la A_w y extracto seco, se puede decir que las fracciones de pectina comerciales y, en especial, las purificadas de pectina de manzana y de cítricos están prácticamente libres de humedad.

Como es sabido, el ácido galacturónico es el azúcar más importante de la pectina y dado que la purificación de las pectinas podía conducir a modificaciones en su contenido, se llevó a cabo la determinación del mismo en ambas pectinas [43].

Hay que destacar a la vista de la Tabla 2, que a pesar de ser la pectina de manzana purificada cinco veces más pequeña que la de cítricos, tiene una concentración de ácido galacturónico en torno a seis veces superior, lo que es una gran ventaja de cara a la relevancia que tiene este monosacárido. Además, se puede observar que el contenido de ácido galacturónico tras la purificación disminuyó de forma ligera debido probablemente a la eliminación de pequeñas proporciones de ácido libre. Zhang y col. [21] y Jae y col. [50] son algunos de los autores que demostraron que la pectina de manzana podía contener una cantidad de ácido galacturónico hasta diez veces superior a la de cítricos.

Tabla 2. Determinación de extracto seco, A_w , pH y contenido de ácido galacturónico, en la pectina de manzana y de cítricos comerciales (PMC y PCC) y purificadas (PMP y PCP).

	PMC	PCC	PMP	PCP
pH	$3,18 \pm 0,03$	$4,55 \pm 0,06$	$3,03 \pm 0,09$	$5,24 \pm 0,32$
A_w	$0,21 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,01$	$0,092 \pm 0,003$	$0,102 \pm 0,005$
Extracto seco	99,8 %	99,8 %	99,9 %	99,9 %
Ácido galacturónico (mg/g)	$430 \pm 0,13$	$71 \pm 0,09$	$420 \pm 0,15$	$65 \pm 0,11$

4.2.2. Análisis de minerales

Otra de las determinaciones necesarias fue el análisis de minerales para comprobar la posible existencia de elementos que pudieran catalizar algún tipo de deterioro. Por ello, y para averiguar la presencia del complejo dimérico RGII-borato que recientemente se ha encontrado en la pared celular de plantas y que contiene metales tales como Ca, Sr, Ba y Pb y micronutrientes como el B que contribuyen a la fuerza e integridad de la planta [49] se procedió a la determinación de minerales mediante Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), cuyo análisis semicuantitativo, se muestra en la Tabla 3. Así, se observa que ninguna de las pectinas pueden contener el complejo dimérico RGII-borato puesto que carecen del elemento B [49]. Los elementos mayoritarios en ambas pectinas fueron Na, K, Ca y Mg.

Tabla 3. Análisis semicuantitativo de minerales en la PMC y PCC.

Elemento	PMC (µg/g)	PCC (µg/g)	Elemento	PMC (µg/g)	PCC (µg/g)
Li	0,00	0,00	Mo	0,12	0,00
Be	0,00	0,00	Ru	0,00	0,00
B	0,00	0,00	Rh	0,00	0,00
Na	4591,98	202,41	Pd	0,02	0,00
Mg	199,37	222,78	Ag	0,00	0,00
Al	11,87	28,67	Cd	0,00	0,00
P	4,18	0,00	In	0,00	0,01
Al	11,87	28,67	Sn	0,00	0,00
Ar	0,00	0,00	Sb	0,00	0,00
K	3152,10	627,04	Te	0,00	0,00
Ca	1696,06	648,03	Th	0,00	0,00
Sc	0,00	0,00	Xe	0,00	0,00
Ti	0,00	0,00	Cs	0,01	0,00
V	0,00	0,15	Ba	10,73	0,78
Cr	1,40	0,40	La	0,02	0,01
Mn	3,25	1,07	Ce	0,07	0,01
Fe	114,11	42,77	Pr	0,01	0,00
Co	0,28	0,37	Nd	0,00	0,00
Ni	1,54	0,86	Sm	0,00	0,00
Cu	10,75	0,94	Eu	0,00	0,00
Zn	0,00	13,89	Gd	0,00	0,00
Ga	0,00	0,00	Tb	0,00	0,00
Ge	0,00	0,00	Ho	0,00	0,00
As	0,00	0,19	Er	0,00	0,00
Se	0,00	0,00	Tm	0,00	0,00
Kr	0,00	0,00	Yb	0,00	0,00
Rb	1,58	0,60	Lu	0,00	0,00
Sr	14,16	4,08	Hf	0,07	0,00
Y	0,04	0,00	Ta	0,00	0,00
Zr	1,55	0,07	W	0,49	0,00
Nb	0,02	0,00	Re	0,01	0,00
Hg	0,00	0,00	Os	0,00	0,00
Tl	0,02	0,00	Ir	0,01	0,01
Pb	0,84	0,02	Pt	0,00	0,00
Bi	0,00	0,00	Au	0,12	0,03

A continuación, se realizó un análisis cuantitativo más preciso de los principales elementos en ambos tipos de pectinas determinándose los siguientes valores:

- i) PMC: Na = 4335,2 µg/g; K = 3396,7 µg/g; Ca = 1725,5 µg/g;
- ii) PCC: K = 720,0 µg/g; Ca = 568,7 µg/g; Mg = 235,4 µg g⁻¹; Na = 207,6 µg/g.

Las elevadas concentraciones que presentaron los elementos K y Na podrían ser debidas a los fertilizantes empleados en el crecimiento de la planta que no se hubieran eliminado durante el procesamiento del vegetal, mientras que los metales Ca y Mg podrían provenir de la dureza del agua utilizada durante el tratamiento de los subproductos y la extracción de la pectina. Igualmente, las dispares concentraciones de los metales que presentaron las pectinas de manzana y de cítricos podría deberse a la variación estructural y composicional de la pectina durante el tratamiento de la fruta y el almacenamiento y el procesado de los subproductos para la obtención de estos heteropolisacáridos [16, 22].

4.3. Determinación cualitativa de la composición monomérica

La caracterización de la composición monomérica de ambas pectinas (manzana y cítricos) es fundamental, ya que los carbohidratos presentes pueden influir en la bioactividad exhibida por estos heteropolisacáridos. Para ello, se procedió al análisis por HPAEC-PAD tras hidrólisis ácida con TFA 2 M de los dos tipos de pectinas purificadas. Dicha hidrólisis ácida tuvo una duración de 4 h a 120 °C por ser las condiciones óptimas que conducen a una mayor liberación de los azúcares neutros según Garna y col. [45]. Concretamente, el dominio HG libera moléculas de ácido galacturónico que permanecen insolubles tras ser hidrolizadas. Además, las cadenas laterales neutras de RGI compuestas en su mayoría por arabinosas y galactosas pueden ser rápidamente escindidas e hidrolizadas a fragmentos de bajo peso molecular. A tiempos superiores, la tasa de destrucción del ácido galacturónico libre es mayor que la tasa de liberación del polímero, formando ciertas cantidades de lactonas [47].

Con objeto de facilitar la elucidación de los azúcares contenidos en la PMP y PCP en primer lugar se compararon los tiempos de retención (t_R) de cada patrón de azúcar con los de la mezcla de azúcares. Así, en la Figura 12 el pico A de la mezcla de azúcares ($t_R=2,800$ min) se asignó tentativamente a fucosa ($t_R=2,667$ min), el pico B ($t_R=3,217$ min) a ramnosa ($t_R=2,900$ min), el pico C ($t_R=3,467$ min) a arabinosa ($t_R=3,650$ min), el pico D ($t_R=4,084$ min) a galactosa ($t_R=4,184$ min) y el pico E ($t_R=4,267$ min) podría corresponder a cualquiera de los siguientes azúcares: glucosa ($t_R=4,300$ min), xilosa ($t_R=4,350$ min) y manosa ($t_R=4,234$ min). Sin embargo, estas asignaciones carecen de una completa certeza por la dificultad que supone la elucidación de los picos coeluidos D y E. Por último, el pico F ($t_R=6,950$ min) pertenece al disacárido, sacarosa ($t_R=7,050$ min). Otro impedimento encontrado fue la incapacidad de esta técnica bajo las condiciones cromatográficas ensayadas para cromatografiar el ácido glucurónico y el ácido galacturónico.

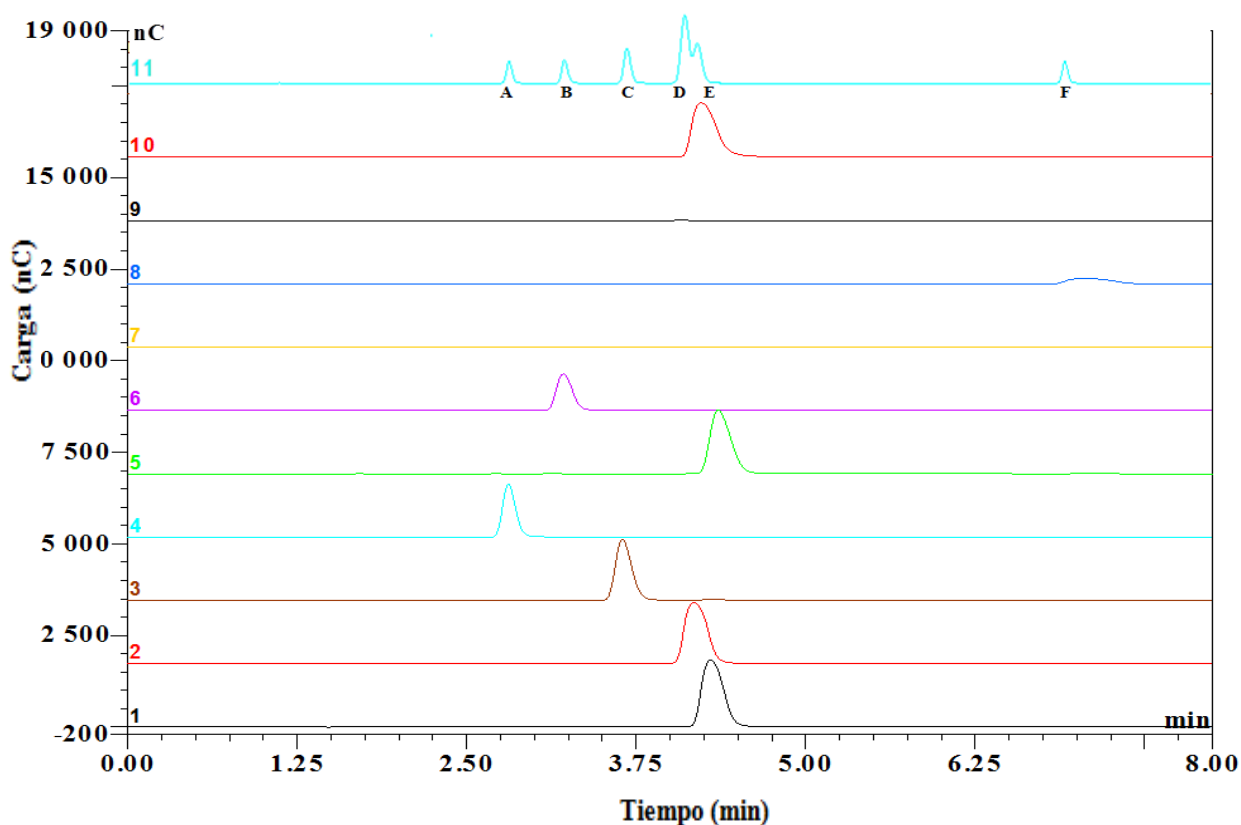


Figura 12. Perfil cromatográfico determinado por HPAEC-PAD de los patrones individuales y de las mezclas de patrones correspondientes a los posibles azúcares presentes en las pectinas. 1= glucosa; 2= galactosa; 3= arabinosa; 4= fucosa; 5= xilosa; 6= ramnosa; 7= ácido glucurónico; 8= sacarosa; 9= ácido galacturónico; 10= manosa; 11= mezcla de azúcares.

Debido a la importante heterogeneidad, en cuanto a composición monomérica, que tienen las pectinas, es difícil conseguir en las condiciones cromatográficas ensayadas una buena identificación de los diferentes monosacáridos debido a las coeluciones de la galactosa, glucosa, xilosa y manosa que conforman las pectinas. Además, los perfiles cromatográficos de las muestras reales presentan una variación en el tiempo de retención en comparación con la mezcla de azúcares (Figuras 13 y 14). A pesar de esto, la identificación de los picos se pudo deducir por la relación entre los tiempos de retención de los picos. Así, el perfil cromatográfico de la PMP (Figura 13) consistió en tres picos minoritarios, dos que eluyeron entre 2,8 y 3,8 min y el restante entre 6,5 y 7,3 min, que representan tentativamente fucosa, ramnosa, arabinosa y sacarosa, respectivamente y un pico mayoritario que podría contener galactosa, glucosa, xilosa y/o manosa. Esta composición cualitativa está de acuerdo en general con lo descrito en la bibliografía donde destaca la proporción de azúcares neutros en orden creciente tales como, arabinosa, galactosa, glucosa, ramnosa, fucosa, xilosa y manosa [45, 51]. Mientras que el perfil cromatográfico de la PCP (Figura 14) consta de tres picos de muy baja concentración, tales como fucosa, ramnosa y arabinosa y un pico de elevada

concentración cuya identificación es complicada ya que podría ser galactosa, glucosa, xilosa y/o manosa. Según la bibliografía, el pico mayoritario está constituido por los monosacáridos mencionados excepto la manosa, además de mostrar la presencia de ácido galacturónico y glucurónico en la PCP [21, 6]. También se indica la presencia de los diferentes azúcares neutros en función de la proporción que ocupen en la estructura de la pectina siendo, por tanto, la arabinosa el azúcar menos presente, la galactosa, la ramnosa y la xilosa contienen una concentración media y la glucosa el azúcar más abundante, encontrándose la galactosa, ramnosa y la xilosa en concentraciones intermedias.

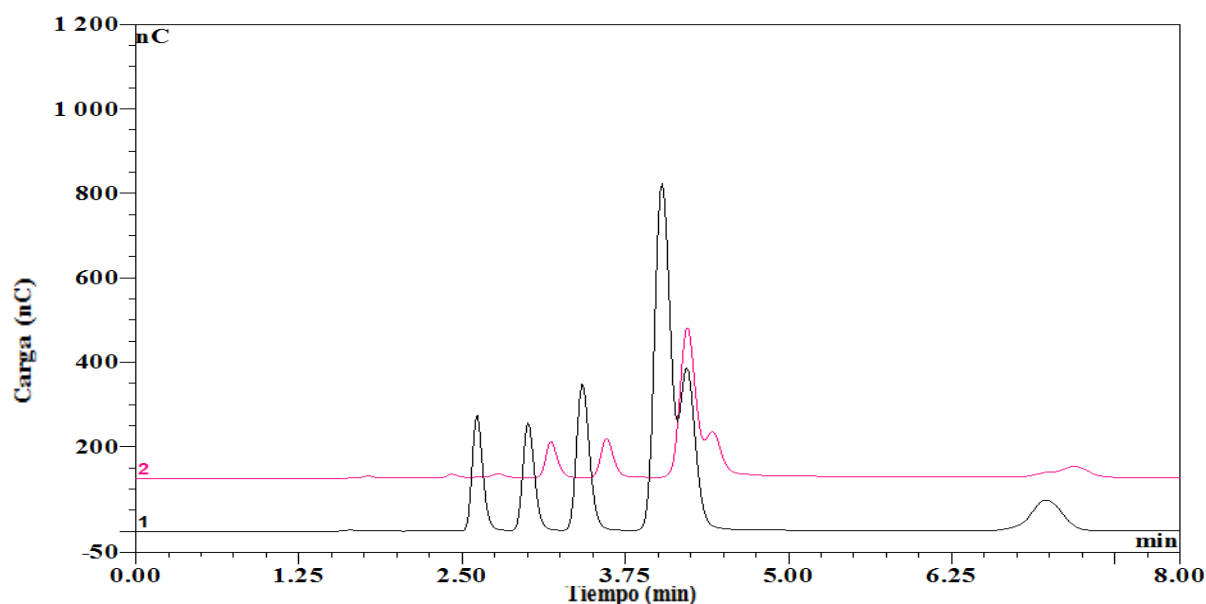


Figura 13. Comparación de los perfiles cromatográficos de la PMP (1, rosa) y la mezcla de azúcares (2, negro) determinados por HPAEC-PAD.

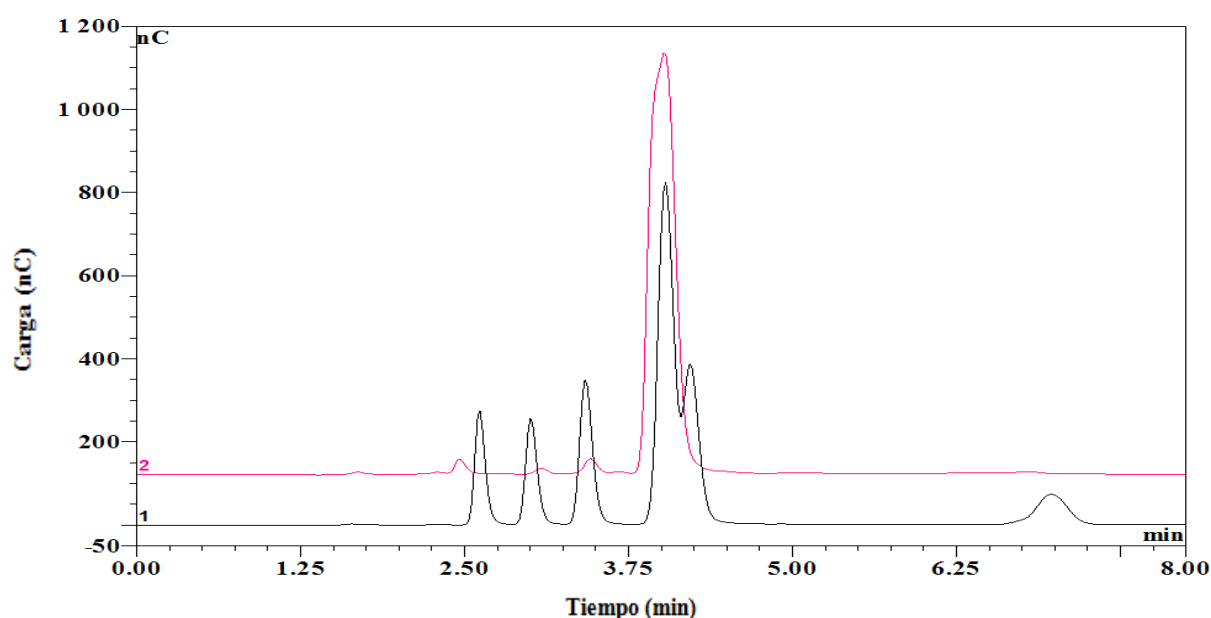


Figura 14. Comparación de los perfiles cromatográficos de la PCP (1, rosa) y la mezcla de azúcares (2, negro) determinados por HPAEC-PAD.

4.4. Puesta a punto de los equipos por US

En función de los distintos modos de operación de los US, la despolimerización puede ser parcial o total y, además, la temperatura puede alcanzar valores elevados que pueden interferir en los efectos de los US, como se ha indicado con anterioridad. Por ello, antes de realizar los tratamientos definitivos, fue preciso realizar un ensayo preliminar en medio acuoso con objeto de comprobar si las temperaturas alcanzadas en cada modo de operación interferían en los efectos de los US y, además, seleccionar las condiciones que pudieran conducir a mayor despolimerización, de acuerdo a los parámetros descritos en la bibliografía.

4.4.1. Con baño de ultrasonidos

En los tratamientos en baño en modo pulsado (Figura 15) se pudo observar que las temperaturas no excedieron de 24,9 °C, siendo ligeramente más altas las correspondientes al modo continuo, ya que los intervalos de tiempos del modo pulsado pudieron evitar la elevación de la temperatura.

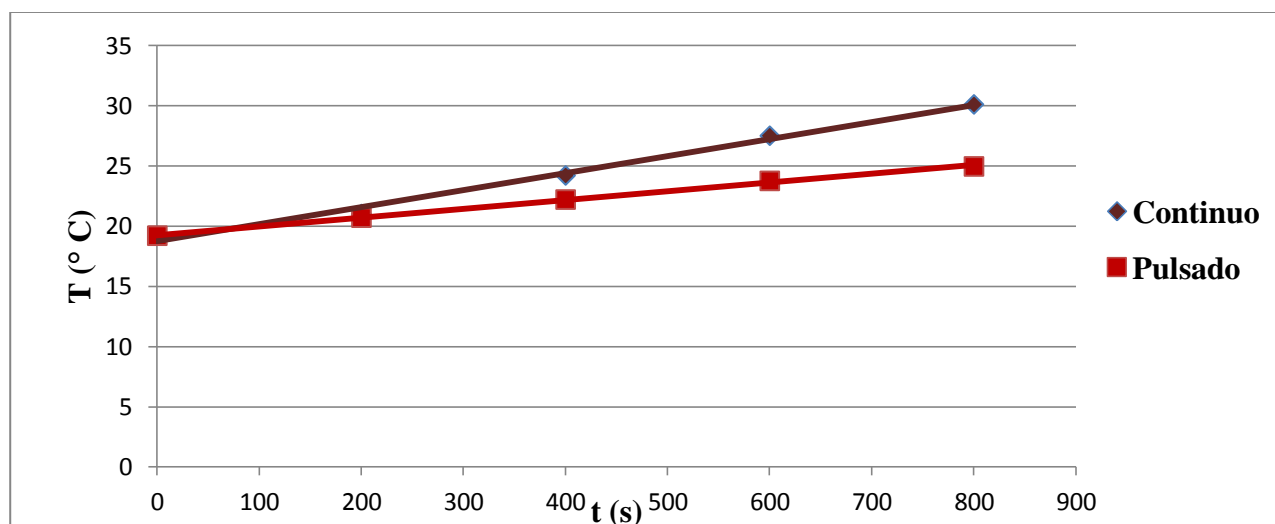


Figura 15. Representaciones gráficas de las variaciones de temperatura en función del tiempo en modo continuo y pulsado.

En la Tabla 4 se puede observar la reducción de la potencia al aumentar la temperatura [52].

Tabla 4. Potencias obtenidas en modo continuo y pulsado a distintas temperaturas en baño de US.

t (s)	Continuo		Pulsado	
	T (°C)	P (W)	T (°C)	P (W)
200	21	6010,2	20,7	5924,6
400	23,4	3357,0	22,2	3185,9
600	25,8	2472,7	23,8	2277,7
800	27,8	1998,4	24,9	1798,7

4.4.2. Con sonda de ultrasonidos

Como puede observarse en las Figuras 16 y 17, para cada modo de operación aumentó la temperatura a medida que aumentaba la amplitud y para cada valor de amplitud la mayor elevación de la temperatura se encontró en el modo continuo. En el caso de 70 y 50% de amplitud apenas se encontraron diferencias en el aumento de la temperatura en dos tipos de ensayos pulsados. Según la bibliografía el modo pulsado combinado con una gran amplitud permite obtener un mayor rendimiento en la despolimerización de polisacáridos [22, 41].

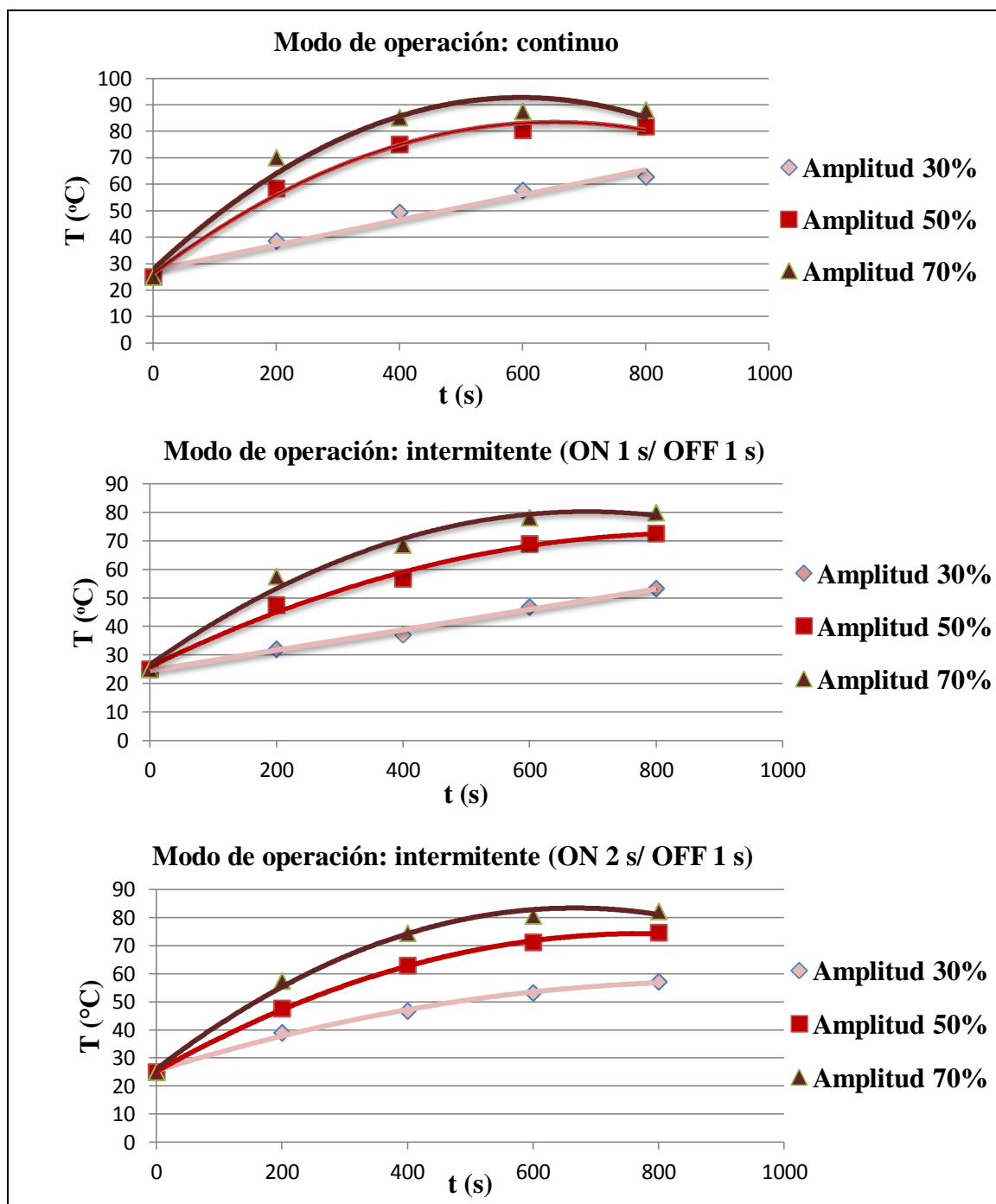


Figura 16. Representaciones gráficas de las variaciones de temperatura en función del tiempo y amplitud para cada modo de operación de US.

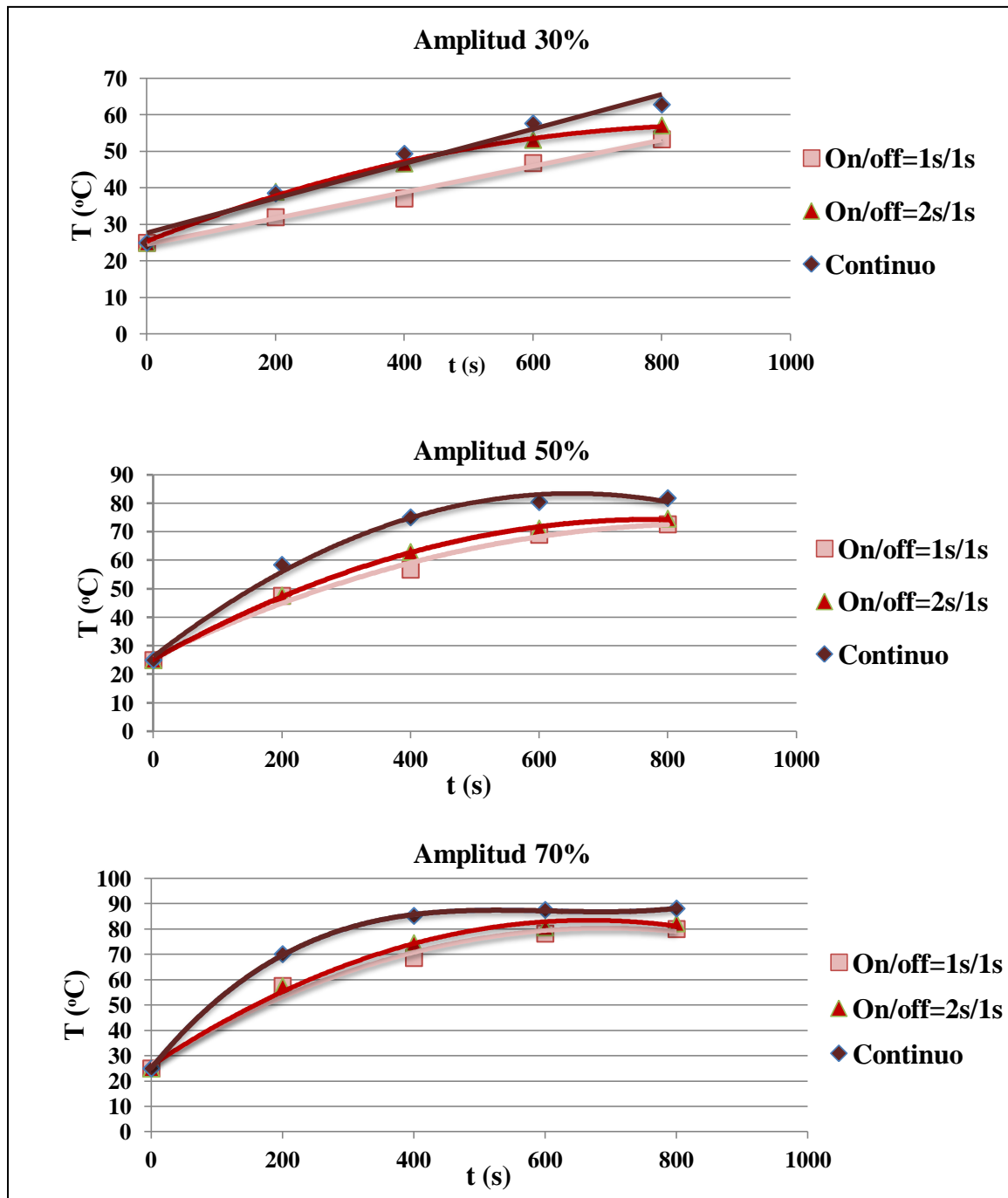


Figura 17. Representaciones gráficas de las variaciones de temperatura en función del tiempo y modo de operación para cada amplitud de US.

A la vista de las Tablas 5, 6 y 7, la potencia de los US disminuye conforme la temperatura aumenta, corroborando el hecho de que a temperaturas superiores a 50 °C se puede minimizar el efecto de los US debido a la menor liberación de energía por parte de la implosión de un elevado número de burbujas pequeñas [35, 36, 50]. En comparación con los tratamientos en baño de US, tanto los aumentos de temperatura como la potencia desarrollada fueron superiores, indicando una mayor intensidad de los mismos.

Tabla 5. Potencias obtenidas en modo continuo a distintas temperaturas y amplitudes en el equipo con sonda de US 450 W.

Continuo	Amplitud 30%		Amplitud 50%		Amplitud 70%	
t (s)	T (°C)	P (W)	T (°C)	P (W)	T (°C)	P (W)
200	38,5	11008,4	24,9	16671,3	70	19994,9
400	49,3	7057,2	58,35	10723,1	85,1	12163,8
600	57,6	5502,4	75	7665,8	87,45	8340,9
800	62,8	4500,3	80,35	5855,4	88	6301,2

Tabla 6. Potencias obtenidas en modo pulsado (ON 1 s/ OFF 1 s) a distintas temperaturas y amplitudes en el equipo con sonda de US 450 W.

ON 1 s/ OFF 1 s	Amplitud 30%		Amplitud 50%		Amplitud 70%	
t (s)	T (°C)	P (W)	T (°C)	P (W)	T (°C)	P (W)
200	31,93	9134,1	47,45	13561,7	57,45	16414,5
400	37,05	5309,8	56,65	8105,6	68,5	9795,9
600	46,75	4470,6	68,9	6576,9	78,1	7451,8
800	53,25	3822,8	72,55	5199,3	79,9	5723,5

Tabla 7. Potencias obtenidas en modo pulsado (ON 2 s/OFF1 s) a distintas temperaturas y amplitudes en el equipo con sonda de US 450 W.

ON 2 s/ OFF 1 s	Amplitud 30%		Amplitud 50%		Amplitud 70%	
t (s)	T (°C)	P (W)	T (°C)	P (W)	T (°C)	P (W)
200	38,9	11122,9	47,55	13590,2	57,35	16385,9
400	46,65	6679,2	62,85	8989,9	74,35	10630,4
600	53,1	5074,4	71,1	6786,2	80,55	7684,8
800	57,05	4093,8	74,55	5341,9	82,15	5883,9

Por lo expuesto anteriormente, se decidió realizar los primeros tratamientos de pectina con US de modo pulsado (ON 2 s/ OFF 1 s) con 70% de amplitud por la menor reducción de potencia que presenta al aumentar la temperatura (Tabla 7) en comparación con el modo intermitente (ON 1 s/ OFF 1 s) recogido en la Tabla 6. Así, se dejó que las muestras alcanzaran la temperatura correspondiente (85,5°C) con el fin de comprobar si el aumento de temperatura incidía negativamente en la despolimerización. Tras conseguir una baja reducción de la Mw (resultados no mostrados) se optó por mantener la temperatura a 45°C mediante un baño de agua-hielo en los tratamientos llevados a cabo a una amplitud de 70% de modo intermitente (ON 2 s/ OFF 1 s).

4.5. Tratamientos de despolimerización de pectinas

4.5.1. Con ácidos

Dado que los tratamientos con ácidos son uno de los métodos más empleados en la despolimerización de pectinas, se realizaron unos ensayos a 50 °C con HCl, HNO₃ y H₂SO₄ en las muestras de PMP y las fracciones resultantes se analizaron mediante un método rápido, eficaz y barato, el DNS. Este es un método de *screening* sencillo capaz de analizar un gran número de muestras y proporcionar resultados meramente cualitativos en un corto periodo de tiempo, reduciendo así los costes y los tiempos de análisis. Este método puede revelar la disminución de Mw debido a la eliminación de azúcares neutros manteniendo su columna vertebral de ácido galacturónico prácticamente intacta [53].

La Figura 18 muestra los resultados correspondientes a los tratamientos de la pectina con los tres ácidos ensayados a dos tiempos, 30 min y 1 h. Como puede observarse ningún ácido en las condiciones ensayadas provocó un aumento del poder reductor, tan solo en el caso del HNO₃ tras 1 h se detectó un ligero aumento. El H₂SO₄ ocasionó una disminución de la concentración de azúcares reductores con respecto al control revelando más que la escisión de los azúcares por despolimerización, su degradación. Las fracciones de PMP acidificadas en HCl, HNO₃ y H₂SO₄ no presentaron diferencias significativas con respecto al control para un p-valor de 0,05. Panchev y col. [41] obtuvieron una mayor reducción de la Mw empleando tiempos de hasta 6 h y a 60 °C de temperatura HNO₃ al 7%. Zhang y col. [21] realizaron los ensayos con HCl 0,1 N a 25 °C durante 24 h y a 80 °C durante 12 h alcanzándose rendimientos de despolimerización del 15,6% y 41,6%, respectivamente.

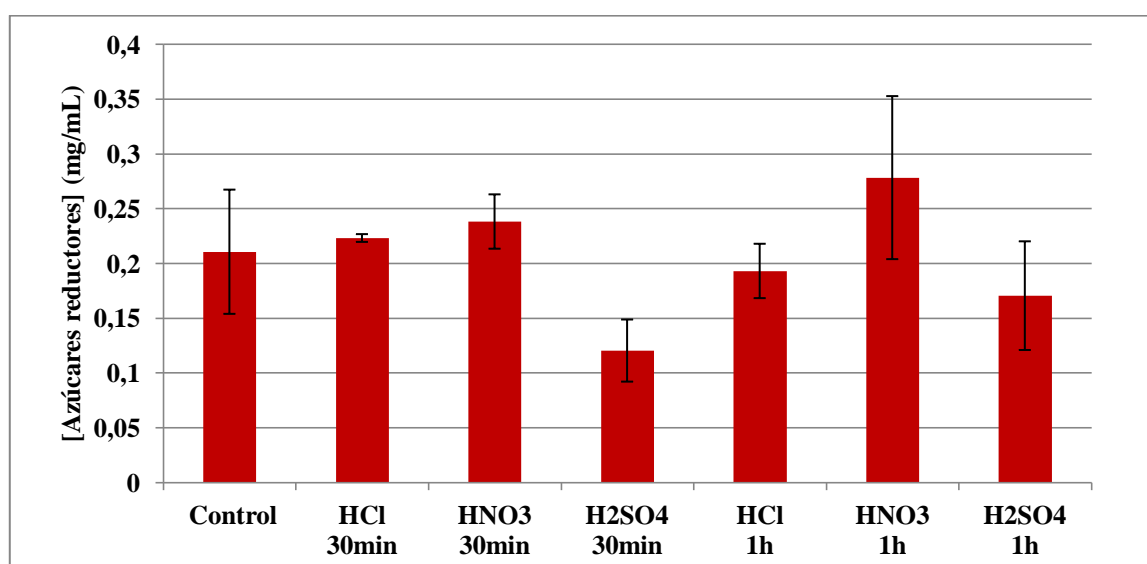


Figura 18. Representación gráfica de las variaciones de las concentraciones de azúcares reductores liberados de PMP en HCl, HNO₃ y H₂SO₄ a 30 min y 1 h según el método del DNS.

4.5.2. Con baño de ultrasonidos

4.5.2.1. Determinación del poder reductor mediante DNS

La posible despolimerización producida en las muestras de PMP tras los tratamientos en el baño de US durante 1 h en modos continuo y pulsado se determinó en primer lugar mediante el método del DNS para posteriormente analizar los posibles cambios en la Mw por SEC. La Figura 19 muestra los resultados correspondientes, comparándolos con la muestra de pectina control antes del tratamiento por US. La ausencia de diferencias significativas entre la muestra control y las muestras tratadas indican una escasa despolimerización tras ambos tipos de tratamientos.

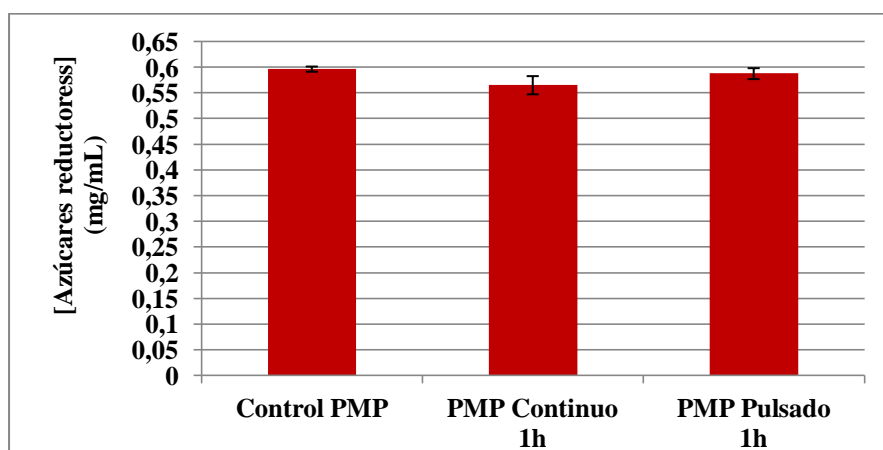


Figura 19. Representación gráfica de las variaciones de las concentraciones de azúcares liberados reductores en los tratamientos con baño US.

4.5.2.2. Estimación y distribución de la Mw mediante SEC

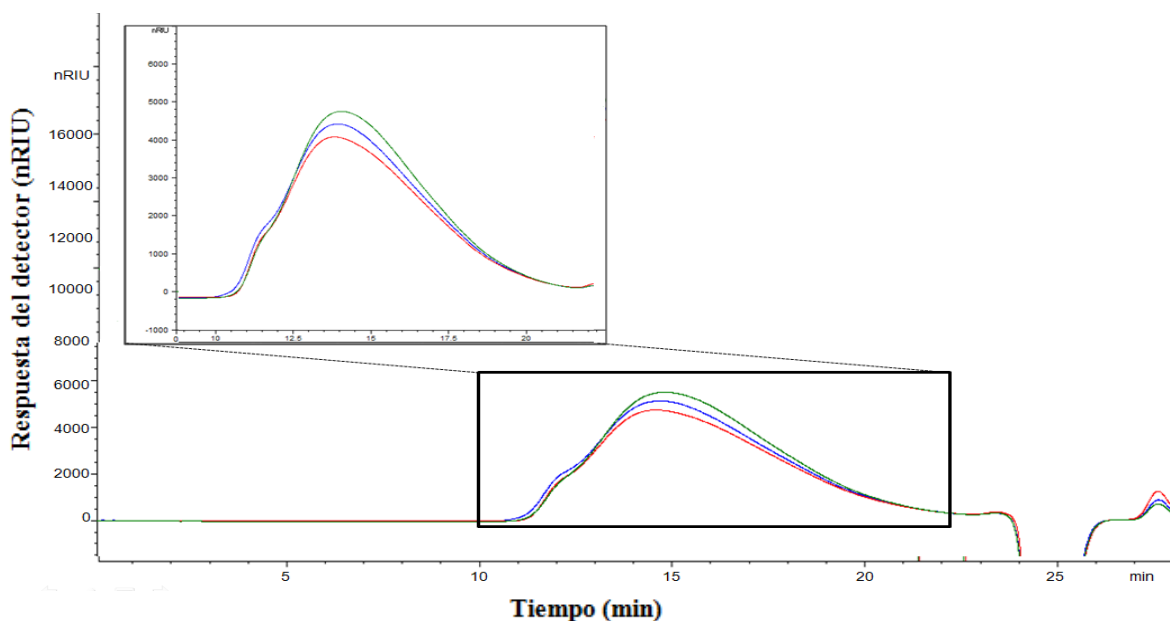


Figura 20. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la muestra control (rojo) y de las tratadas de PMP en modo continuo (verde) y en modo pulsado (pulsado) mediante US baño.

La Figura 20 y la Tabla 8 muestran los resultados correspondientes al análisis por SEC de las muestras de pectina tratadas en baño de US. Como puede observarse y, de acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado anterior, el grado de despolimerización mediante este procedimiento fue muy bajo.

Tabla 8. Estimación y distribución de la Mw y porcentaje de despolimerización obtenidas en las muestras PMP tratadas en baño de US.

	Mw (kDa)*	Despolimerización (%)
Control	660	0
Continuo	583	9,6
Pulsado	587	9,1

*Masa molecular estimada correspondiente al máximo del pico cromatográfico.

4.5.3. Con sonda de ultrasonidos

Conocida la baja despolimerización que se podría conseguir en medio ácido y con baño de US y con el fin de obtener una mayor despolimerización, ambos tipos de pectina se sometieron a tratamientos de US con sonda.

4.5.3.1. Determinación del poder reductor mediante DNS

La concentración de azúcares reductores de las muestras sonicadas de PMP permanecieron constantes, es decir, sin diferencias significativas en comparación con su control. Sin embargo, las fracciones de PCP tratadas durante 60 min y 450 W presentaron diferencias significativas incrementando la liberación de monosacáridos reductores, lo que evidenciaba su despolimerización (Figura 21).

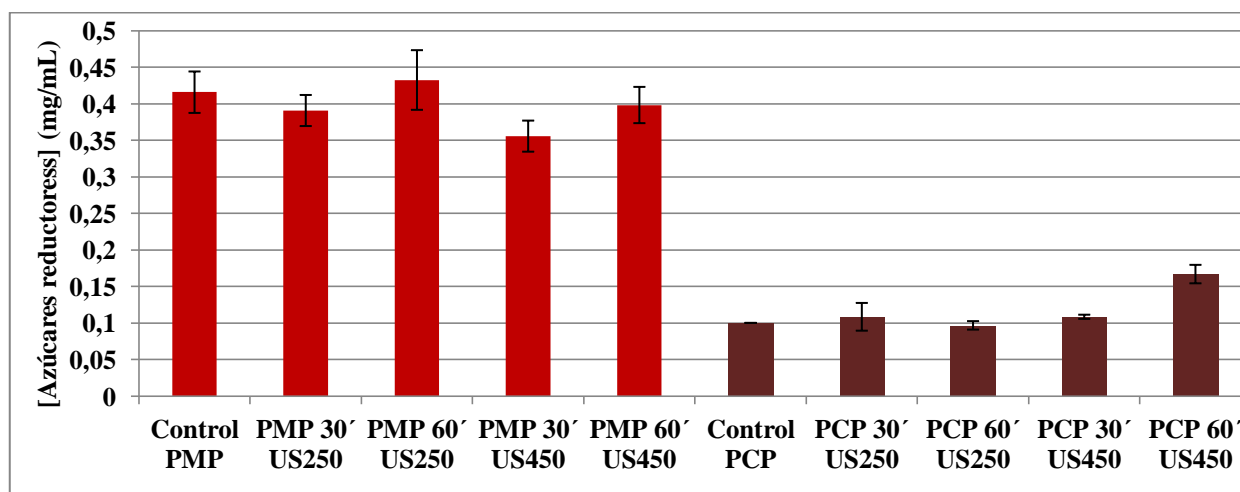


Figura 21. Representación gráfica de las variaciones de las concentraciones de azúcares reductores liberados reductores de PMP y PCP en los tratamientos US sonda.

4.5.3.2. Estimación y distribución de la M_w mediante SEC

Para estimar de una manera más exacta y precisa en cuánto se veía traducida la despolimerización de las pectinas tras los distintos tratamientos de US a las que fueron sometidas, se analizaron las muestras por SEC.

Las Figuras 22 y 23 plasman una mayor ruptura de las cadenas cuanto más desplazado hacia la derecha se encuentra el máximo de pico del tratamiento con respecto al control.

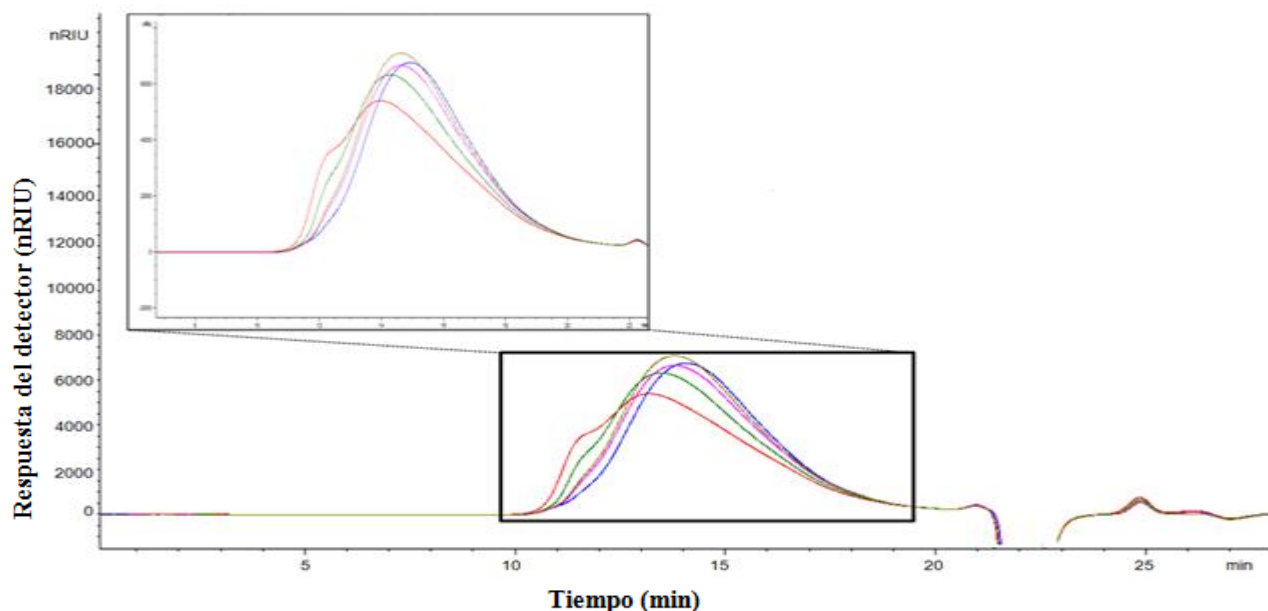


Figura 22. Perfil cromatográfico obtenido por SEC del control (rojo) y de las muestras tratadas de PMP a los 30 min en el equipo de 250 W (verde oscuro) y 450 W (verde claro) y a los 60 min en el sonicador 250 W (rosa) y 450 W (azul) mediante US sonda.

A la vista de las Tablas 9 y 10 se puede afirmar que las fracciones sometidas en el sonicador de menor potencia a los 30 min son las que menor despolimerización revelan con un 14,3% en el caso de la PMP y un 73,2 en PCP; mientras que las mayores reducciones de M_w es decir, 51,4% en PMP y 87,4% en PCP se consiguieron en el US de 450 W durante 60 min. En cuanto al resto de ensayos, los tratamientos de las muestras a los 60 min en el equipo de 250 W y la sonicación de las fracciones durante 30 min en el equipo de 450 W dieron lugar prácticamente a la misma despolimerización, 37,5 y 32,2%, respectivamente en la de manzana y 82,1 y 85,5% en la cítrica, lo que pone de manifiesto la misma efectividad de los US. Zhang y col. [22] consiguieron una reducción de M_w del 50% en la pectina de manzana purificada cuando se sonicó 60 min manteniendo la temperatura a 5 °C y empleando la misma amplitud que la de esta Memoria (30%).

Además, en la pectina de cítricos purificada se obtuvo una despolimerización del 70% sonicando la pectina durante 1,5 h a 25 °C [21, 23]. Los datos recogidos en la bibliografía en

comparación con los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Máster, son inferiores debido principalmente a dos factores: i) La temperatura utilizada por Zhang y col. [21, 37] es tan baja que dificulta la degradación mecánica durante el colapso de las burbujas durante la cavitación [37]; ii) El diámetro de la sonda, debido a que cuanto menor sea su valor, mayor ruptura de la cadena va a conseguir. Así la sonda empleada en la bibliografía fue de 13 mm mientras que la de nuestros ensayos tenía un diámetro de 3 mm.

Tabla 9. Estimación y distribución de Mw y porcentaje de despolimerización obtenidas en las muestras PMP tratadas por US sonda.

	Mw (kDa)*	Despolimerización (%)
Control PMP	660	0
PMP 30' US250	563	14,3
PMP 60' US250	410	37,5
PMP 30' US450	445	32,2
PMP 60' US450	319	51,4

*Masa molecular estimado correspondiente al máximo del pico cromatográfico.

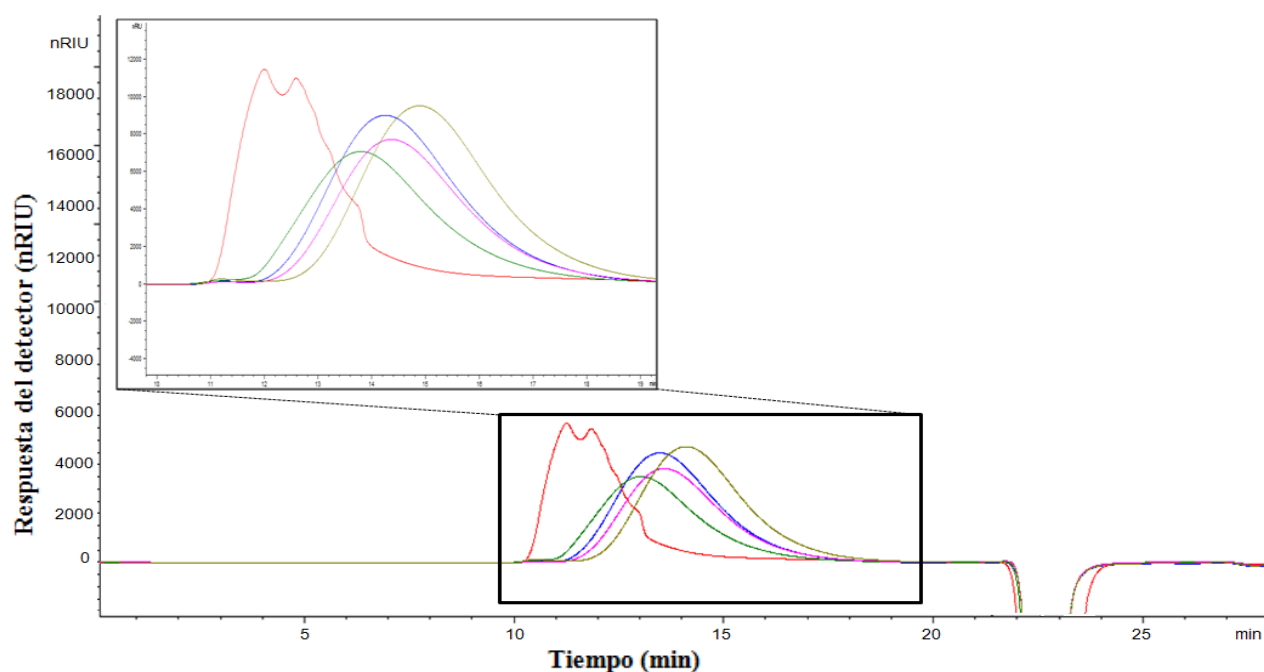


Figura 23. Perfil cromatográfico obtenido por SEC del control (rojo) y de las muestras tratadas de PCP a los 30 min en el equipo de 250 W (verde oscuro) y 450 W (rosa) y a los 60 min en el sonicador 250 W (azul) y 450 W (verde claro) mediante US sonda.

Los datos recogidos en las Tablas 9 y 10 muestran que la sonicación de las muestras en el US de mayor potencia durante 60 min es el tratamiento más eficaz, ya que condujo a un mayor grado de despolimerización en ambos tipos de pectina. El aumento de potencia no siempre garantiza

la reducción de Mw, ya que se pueden formar una gran cantidad de burbujas de cavitación que pueden actuar como barreras contra la transmisión de energía en el sistema disminuyendo su efectividad [10, 21].

Tabla 10. Estimación y distribución de Mw y porcentaje de despolimerización obtenidas en las muestras PCP tratadas por US sonda.

	Mw (kDa)*	Despolimerización (%)
Control PCP	2.900	0
PCP 30' US250	775	73,2
PCP 60' US250	518	82,1
PCP 30' US450	419	85,5
PCP 60' US450	363	87,4

*Masa molecular estimado correspondiente al máximo del pico cromatográfico.

El hecho de que la pectina de cítricos alcance una mayor despolimerización puede deberse a que posee una Mw en torno a cinco veces más que la de manzana. Las cadenas largas son más vulnerables a su escisión por la acción de fuerzas hidrodinámicas, mientras que los heteropolisacáridos con cadenas que tengan un tamaño por debajo de un valor determinado están menos expuestas a su degradación [21-23].

4.5.3.3. *Determinación de la turbidez*

Una reducción en la longitud de cadena de la pectina también puede alterar las propiedades ópticas de la solución, es decir, uno de los posibles efectos que puede tener el tratamiento de US sobre las muestras de pectinas es la disminución de la turbidez. En general, las soluciones más transparentes y, por tanto, menos turbias son más deseables en la industria alimentaria [25].

La medida de la turbidez puede dar una aproximación preliminar sobre la despolimerización originada en cada tratamiento, ya que la reducción de la absorbancia está directamente relacionada con menores longitudes de cadena en la estructura de la pectina y con el incremento de la transparencia [25, 37]. Así, de acuerdo con la Figura 24, las muestras de PMP y PCP sonicadas presentan diferencias significativas con su correspondiente control evidenciando por un lado, una mayor despolimerización y por otro, una menor turbidez. Esto se puede explicar porque en el control las moléculas de pectina forman una red fuerte que se compone de muchas zonas de unión cuyo mecanismo de actuación es dispersar la luz gracias a que actúan como partículas discretas. En las muestras sonicadas la turbidez es menor puesto que estas cadenas se rompen reduciendo así la longitud y la fuerza de zonas de unión [25]. Además de las diferencias presentadas en la variación de la turbidez dentro de las fracciones de cada pectina, también se han encontrado diferencias

significativas entre ambas donde la pectina de manzana presenta un valor de absorbancia 0,08 unidades inferior que la de cítricos. Por esto se puede afirmar que en la pectina de manzana, se consigue mayor transparencia que la PCP cuando la muestra es sonicada 60 min en el US de mayor potencia.

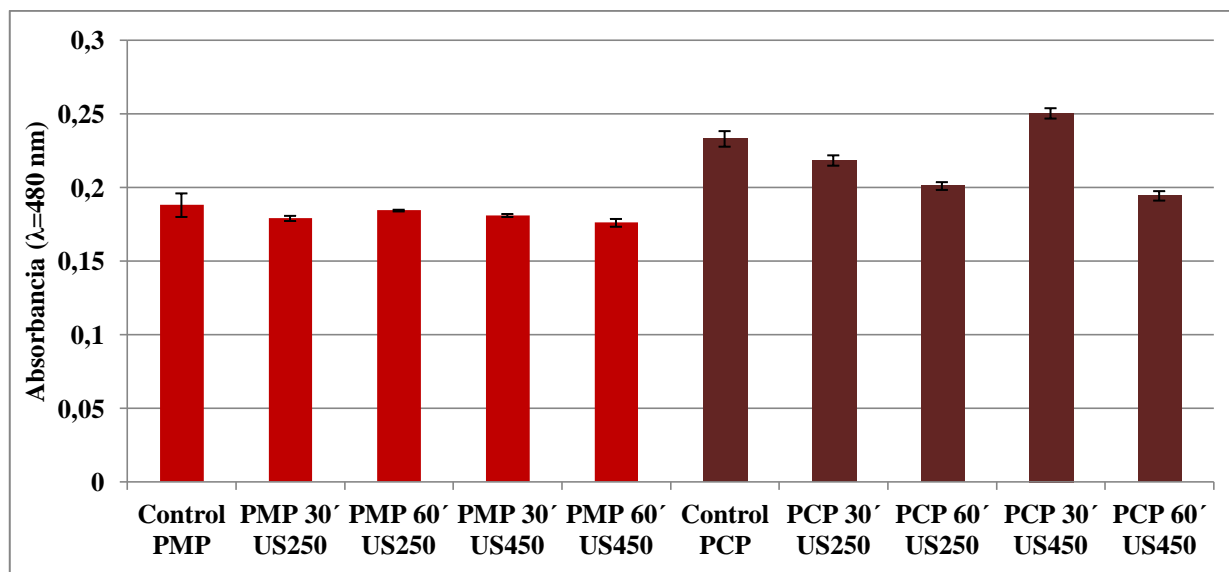


Figura 24. Representación gráfica de las variaciones de turbidez en las muestras PMP y PCP.

4.5.3.4. Estimación del grado de esterificación (DE) por FTIR

Con el fin de complementar los resultados del SEC que indican la magnitud de la despolimerización pero sin revelar en qué grupos se traduce esa reducción de Mw, se recurrió al análisis espectroscópico por FTIR. Además, esta técnica permite explorar el potencial de las aplicaciones a las que cada muestra de PMP y PCP sonicadas estarían destinadas según sean de bajo metoxilo (LM, 0-50% DE) o alto metoxilo (HM, 51-100% DE) respectivamente, mediante la estimación del DE. En los espectros FTIR (Figura 25 y Figura 26), el DE se reduce al aumentar la intensidad y el área de la banda correspondiente a la vibración de tensión asimétrica de los ésteres de los grupos carboxilos (COO-R) a 1747 cm^{-1} y al disminuir el área de la señal 1632 cm^{-1} perteneciente a la vibración de tensión simétrica de los iones carboxilato [21, 53, 54].

De la Tabla 11 se puede deducir que todas las muestras de PMP tratadas por US presentan las mismas bandas que su control, lo que indica que, aunque la despolimerización reduce la presencia en gran medida de algunos grupos, no los elimina por completo. La amplia y fuerte banda de absorción que aparece en torno a 3421 cm^{-1} corresponde a la vibración de O-H debido a los enlaces inter e intramoleculares de hidrógeno localizados en la cadena principal del ácido galacturónico. Tal y como refleja la Figura 25, esta banda es más ancha tras la sonicación debido a la reducción del número de enlaces O-H y a la aparición de la banda de vibración del enlace O-CH₃

de los metil ésteres del ácido galacturónico que se encontraba enmascarada por la señal del enlace O-H [53, 55, 56].

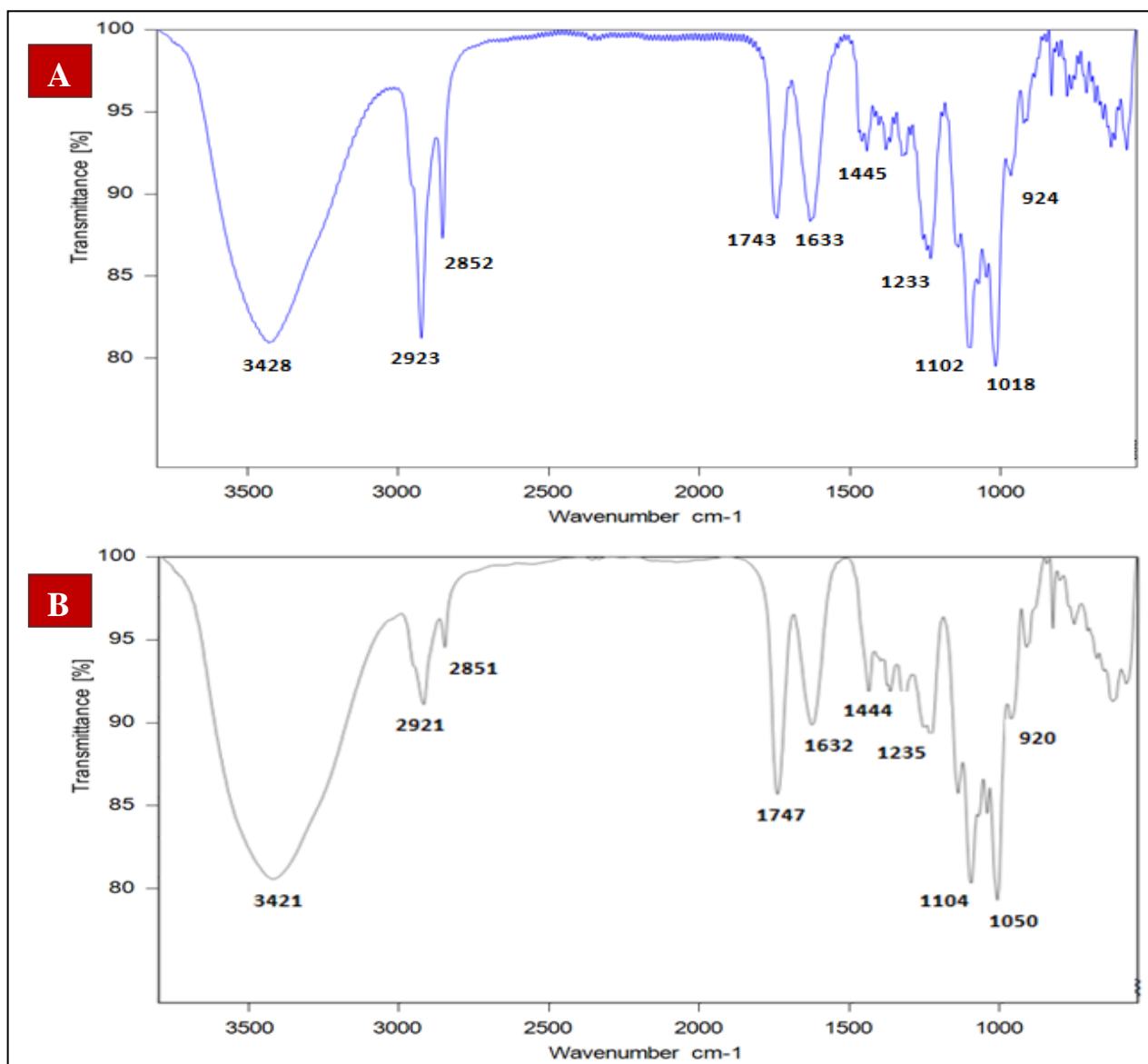


Figura 25. Espectros FTIR de la PMP: A) Control B) Sonicada 60 min en el US 450 W.

Además, la reducción en las intensidades de las dos bandas asignadas a las vibraciones de tensión C-H (2923 y 2852 cm^{-1}) que incluye los grupos $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ y la disminución de la anchura de la banda de flexión del enlace C-H con respecto a la muestra control, evidencian la despolimerización de las cadenas carbonadas de la PMP [21, 53, 55, 56]. La banda de intensidad fuerte asignada a la vibración de tensión asimétrica de los ésteres de los grupos carbonilos a 1747 cm^{-1} aumenta su área y la señal 1632 cm^{-1} , perteneciente a la vibración de tensión simétrica de los iones carboxilato, disminuye su superficie como consecuencia de la variación del DE [54, 55, 56]. A pesar de la débil intensidad y poca importancia de la señal que existe en torno a 1444 cm^{-1} se aprecia una reducción en la anchura de la banda de flexión del enlace C-H del espectro de la

muestra sonicada 60 min en un US de 450 W de potencia en relación con el control, lo que equivale a una importante reducción de Mw como consecuencia de la despolimerización [21]. Una moderada intensidad combinada con bandas más finas en el extremo más largo situada alrededor de 1233 cm^{-1} que corresponde a la vibración dentro del plano del enlace O-H puede ser el resultado de combinaciones de tonos [56]. En la Tabla 11 se observa un aumento de la longitud de onda de la señal de vibración de tensión simétrica del grupo C-O-C que pasa de 1018 cm^{-1} en el control a 1050 cm^{-1} en la PMP más despolimerizada sonicada 60 min en el US 450 debido a que la vibración simétrica cambia a asimétrica [56]. Una leve banda presente a 924 cm^{-1} aproximadamente podría ser consecuencia de una flexión fuera del plano producida por el enlace OC-OH [56]. Las bandas de intensidad moderada y débil situadas en un intervalo de 1300 y 800 cm^{-1} constituyen la región de huella dactilar de la pectina [53, 56].

Tabla 11. Bandas correspondientes al espectro FTIR de los controles y PMP tratadas en los sonicadores 250 y 450 W a tiempos de 30 y 60 min.

	Pico (cm^{-1})				
	Control	30' US 250	60' US 250	30' US 450	60' US 450
O-H st	3428	3416	3420	3420	3421
-C-H st	2923, 2852	2954, 2928	2922, 2851	2922, 2851	2921, 2851
C=O st as	1743	1746	1742	1747	1747
C=O st s	1633	1631	1629	1631	1632
-C-H δ	1445	1444	1443	1443	1444
O-H δ ip	1233	1237	1234	1237	1235
C-O-C st as	1102	1105	1106	1104	1104
C-O-C st sim	1018	1017	1018	1018	1050
OC-OH δ oop	924	919	921	919	920

st: tensión; as: asimétrica; s: simétrica; δ : flexión; ip= dentro del plano; oop: fuera del plano.

En cuanto a los DE correspondientes a las fracciones sonicadas de PMP en el equipo de 250 W durante 30 min y 1 h fueron de 61 y 59%, respectivamente, clasificándose como geles HM. Además, las muestras tratadas en el US con el que mayor despolimerización se consiguió, es decir en el sonicador de 450 W, mostraron un DE de 51% a los 30 min, siendo un gel HM mientras que, en 1 h el DE obtenido fue de 46%, lo que indicaba que se trataba de un gel LM. Así, se puede indicar que el grado de esterificación de la pectina de manzana disminuye conforme el efecto de los US es mayor, es decir, a mayor despolimerización de las pectinas, tal como recoge Zhang y col. [21].

De la misma manera que la pectina de manzana purificada, en la Figura 26 se encuentran los espectros de IR de la pectina de cítricos purificada. Tanto en la Figura 26 como en la Tabla 12 se aprecia que las muestras tratadas de PCP por US presentan las mismas bandas que la muestra control, excepto en el caso de las vibraciones de tensión C-H que pasan de dos bandas, una ancha de intensidad moderada a 2923 cm^{-1} y una muy pequeña y débil a 2852 cm^{-1} a sólo una señal de intensidad moderada a 2922 cm^{-1} [21, 55, 56] reflejando la despolimerización de las cadenas carbonadas de la PCP. Tras sonicar la muestra se aprecia que la banda de tensión del enlace O-H situado en torno de 3412 cm^{-1} ha aumentado un 10% su transmitancia en comparación de la muestra control posiblemente, por la aparición de una banda que corresponde a la vibración del enlace O-CH₃ de los metil ésteres del ácido galacturónico y que se encontraba enmascarada por la amplia señal del enlace O-H [55, 56]. La PCP únicamente presenta una banda de intensidad fuerte inalterada a 1636 cm^{-1} relacionada con las vibraciones de tensión simétrica de los iones carboxilato tras someter la muestra al tratamiento físico [53, 55-56].

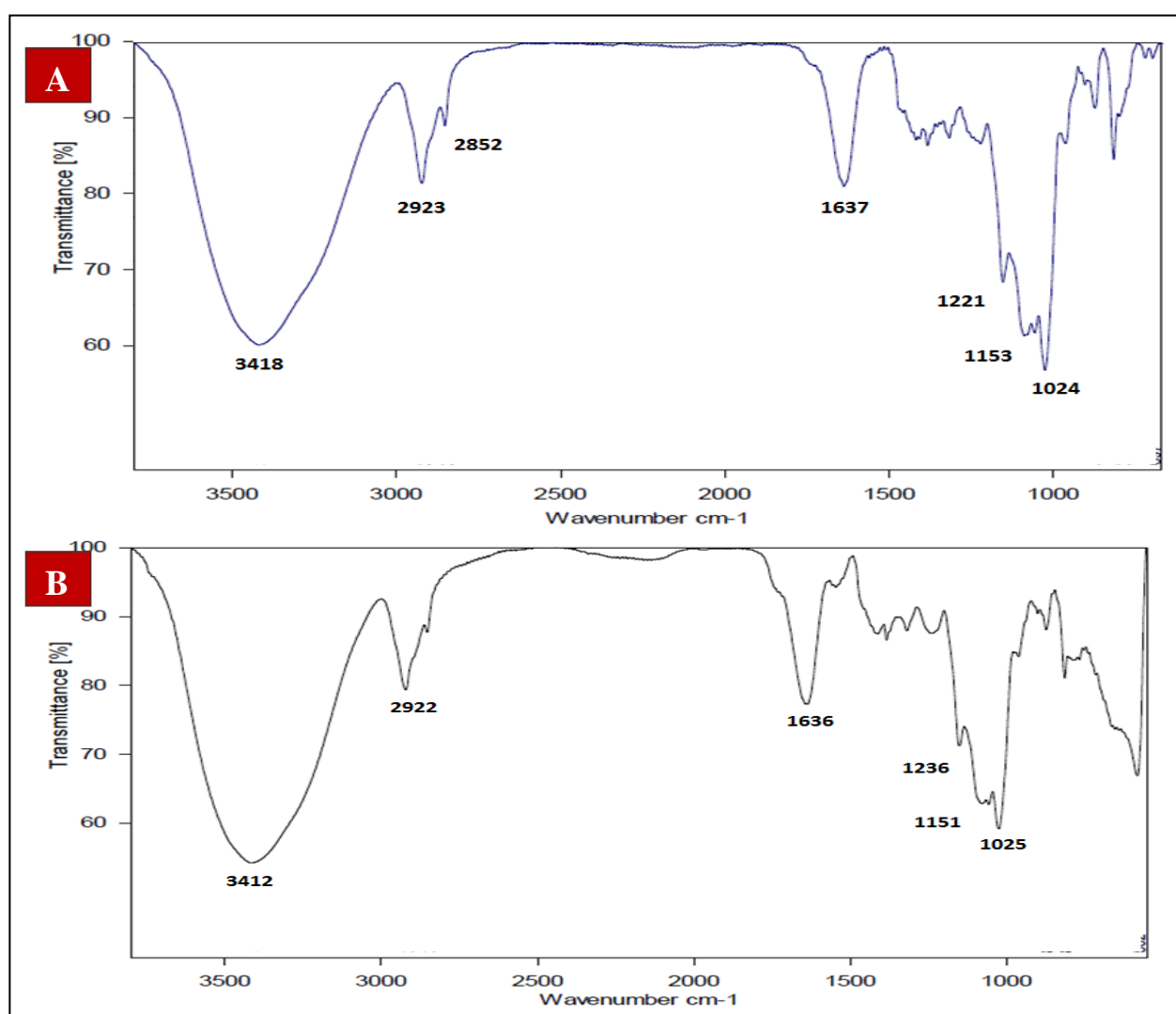


Figura 26. Espectros FTIR de la PCP: A) Control B) Sonicada 60 min en el US 450 W.

Las bandas que engloban la huella dactilar de la pectina, como flexión dentro del plano del enlace O-H (1221 cm^{-1}), vibraciones de tensión asimétrica (1153 cm^{-1}) y simétrica (1024 cm^{-1}) del enlace C-O-C no presentan variación alguna.

Tabla 12. Bandas correspondientes al espectro FTIR de los controles y PCP tratadas en los sonicadores 250 y 450 a tiempos de 30 y 60 min.

	Pico (cm^{-1})				
	Control	30' US 250	60' US 250	30' US 450	60' US 450
O-H st	3418	3409	3416	3412	3412
-C-H st	2923, 2852	2923	2923	2924	2922
C=O st	1637	1637	1636	1637	1636
O-H δ^{ip}	1221	1220	1223	1219	1236
C-O-C st as	1153	1152	1153	1153	1151
C-O-C st sim	1024	1024	1024	1024	1025

st: tensión; as: asimétrica; s: simétrica; δ : flexión; ip= dentro del plano.

Teniendo en cuenta que el DE es la relación existente entre el área de la banda 1743 cm^{-1} (COO-R) y la suma de las áreas de las bandas 1747 cm^{-1} (COO-R) y 1632 cm^{-1} (COO⁻), no se puede conocer el DE de la muestra control y sonicadas de la PCP debido a la ausencia de la banda 1747 cm^{-1} que corresponde a la tensión asimétrica de los ésteres de los grupos carbonilos. En caso de que el espectrómetro FTIR hubiera detectado señal, ésta sería tan pequeña que el grado de esterificación tendría un valor en torno al 1% dando lugar a geles de pectina de bajo metoxilo.

4.5.3.5. Determinación del ácido galacturónico

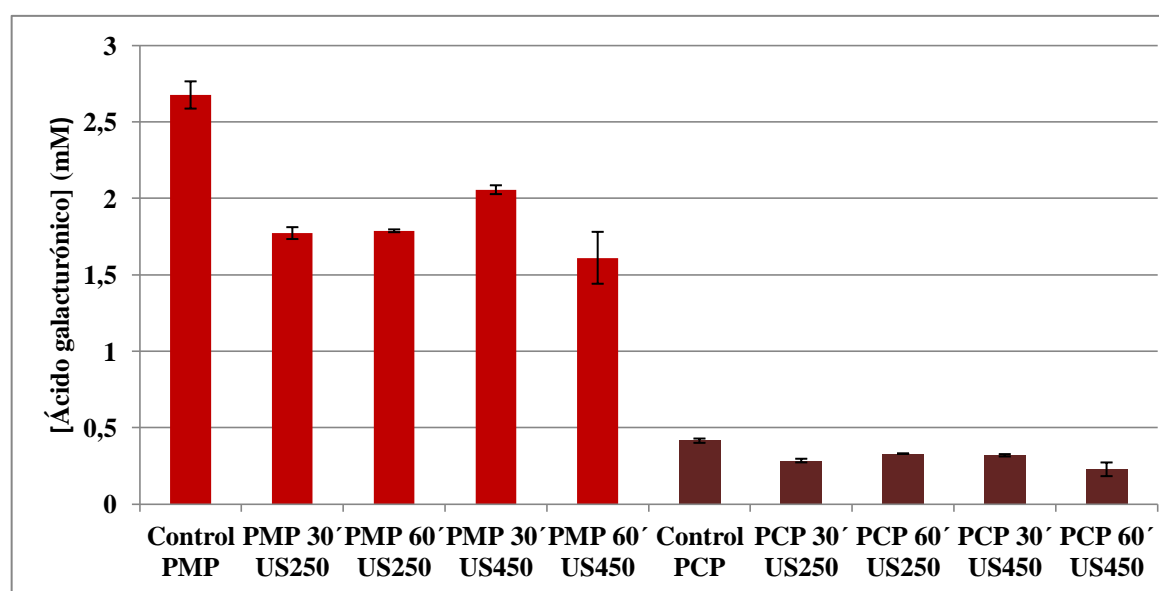


Figura 27. Representación gráfica de las variaciones del contenido de ácido galacturónico en las muestras tratadas de PMP y PCP con respecto a sus correspondientes controles.

Por lo que se refiere al contenido en ácido galacturónico como, se observa en la Figura 27, se produjo una disminución significativa como consecuencia de la aplicación de US en el caso de la pectina de manzana respecto al control, pero apenas varió durante los tratamientos. Sin embargo, en el caso de la pectina de cítricos no se observaron diferencias significativas en ninguna de las muestras tratadas con US respecto a las muestras sin tratar.

4.5.4. Con ácidos y ultrasonidos de sonda

La presencia de ácidos y la aplicación de US sonda en ambas muestras de pectina podrían tener un efecto sinérgico y presentar una despolimerización mayor que la obtenida únicamente por US. Para comprobar esta hipótesis, las fracciones de la PMP se analizaron por SEC.

4.5.4.1. Estimación y distribución de la M_w mediante SEC

Las Figuras 28 y 29 y las Tablas 13 y 14 demuestran que la mayor reducción de M_w se produce sonicando ambas pectinas en el US 450 W durante 60 min.

Como se ha comentado con anterioridad, los cromatogramas obtenidos por SEC plasman una mayor ruptura de las cadenas cuanto más desplazado hacia la derecha se encuentra el máximo de pico del tratamiento con respecto al control.

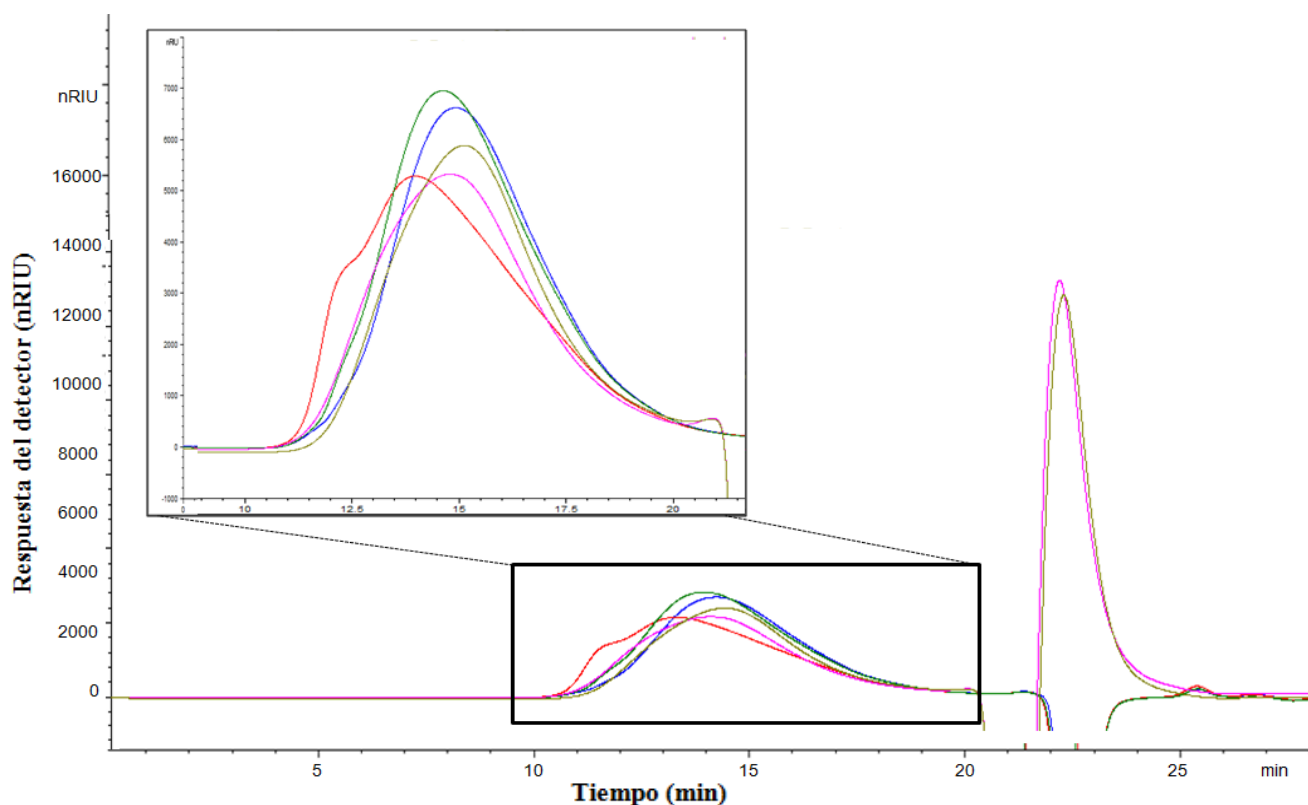


Figura 28. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la muestra control (rojo), de los tratamientos de PMP en H₂O a los 30 min (verde oscuro) y 60 min (azul) y en presencia de HNO₃ a los 30 min (rosa) y a los 60 min (verde claro) mediante US sonda.

La PMP presenta una baja despolimerización, menos de la mitad que se obtiene en disolución acuosa aplicando US sonda, debido probablemente a que la presencia del ácido podría modificar los grupos esterificados y disminuir la susceptibilidad de la pectina a reacciones β -eliminación [21, 33].

Tabla 13. Estimación y distribución de Mw y porcentaje de despolimerización obtenido en las muestras PMP tratadas en presencia de H₂O y HNO₃ por sonda US.

	Mw (kDa)*	Despolimerización (%)
Control PMP	660	0
PMP 30' US450	445	32,2
PMP 60' US450	319	51,4
PMP 30' US450 + HNO₃	565	14
PMP 60' US450 + HNO₃	472	28,2

*Masa molecular estimado correspondiente al máximo del pico cromatográfico.

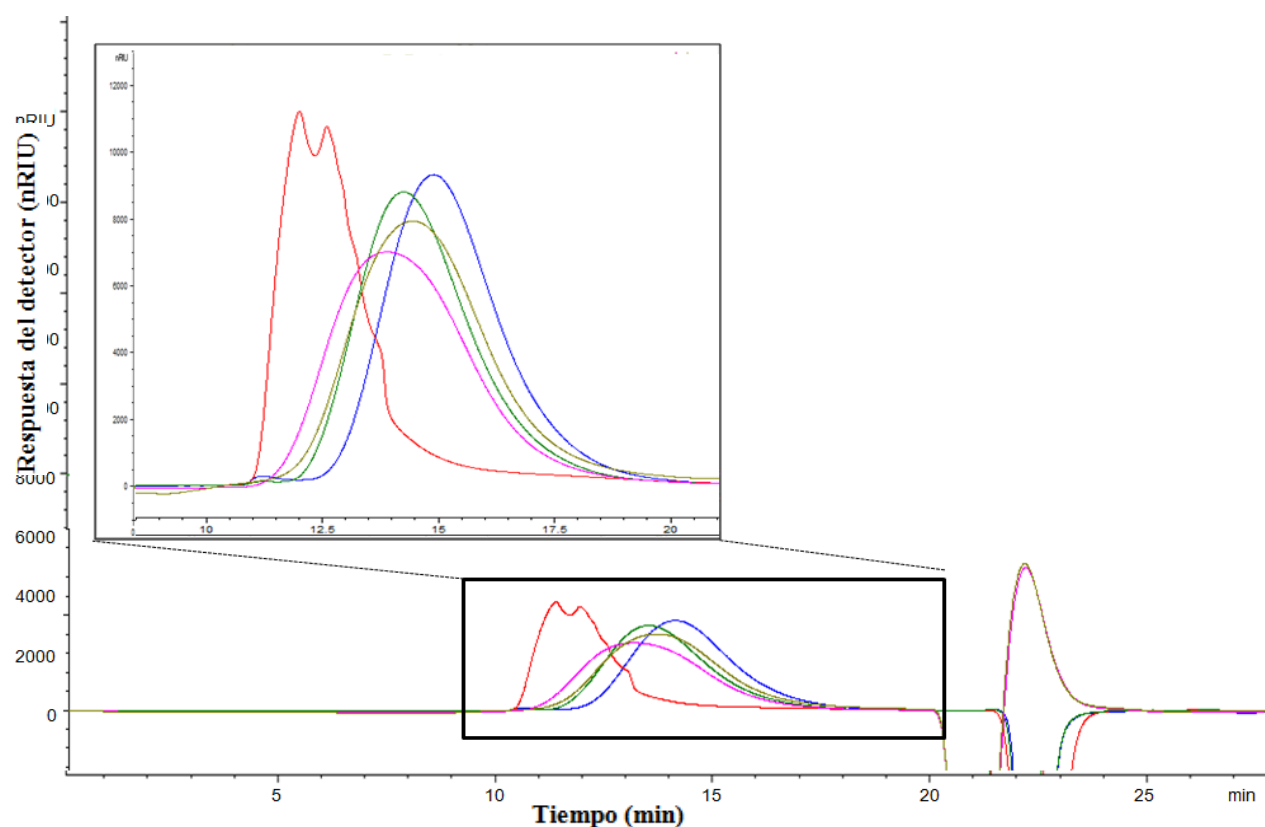


Figura 29. Perfil cromatográfico obtenido por SEC de la muestra control (rojo), de los tratamientos de PCP en H₂O a los 30 min (verde oscuro) y 60 min (azul) y, en presencia de HNO₃, a los 30 min (rosa) y a los 60 min (verde claro) mediante US sonda.

En cambio, la PCP se despolimeriza prácticamente lo mismo en medio ácido o acuoso. Esto indica que la combinación de ácidos con los US no tiene ningún efecto positivo, lo cual es una

ventaja de cara a las aplicaciones alimentarias, ya que no es necesario utilizar técnicas costosas y agresivas para eliminar el ácido. Zhang y col. [21] realizaron tratamientos de pectina de cítricos con US a 25°C, en presencia de HCl y durante 1,5 y 2,5 h siendo la despolimerización de 33,5 y 63,8% respectivamente. Al igual que en nuestro caso, la Mw disminuyó lo mismo en presencia de agua ó ácido. Además, la reducción de Mw en sus fracciones de PCP fue menor (63,5%) que el obtenido en el presente trabajo, lo que podría ser debido a los distintos ácidos empleados y a que la temperatura no era lo suficientemente alta para que contribuyera a la degradación mecánica [10, 21].

Tabla 14. Estimación y distribución de Mw y porcentaje de despolimerización obtenido en las muestras PCP tratadas en presencia de H₂O y HNO₃ por sonda US.

	Mw (kDa)*	Despolimerización (%)
Control PCP	2.900	0
PCP 30' US450	419	85,5
PCP 60' US450	363	87,4
PCP 30' US450 + HNO₃	627,7	78,6
PCP 60' US450 + HNO₃	404	86

*Masa molecular estimado correspondiente al máximo del pico cromatográfico.

4.6. Determinación de la actividad antioxidante

Es ampliamente reconocido que las especies reactivas del oxígeno, tales como aniones de oxígeno, radicales libres y peróxidos se pueden generar durante las funciones celulares y causar daño oxidativo contribuyendo a la aparición de determinadas enfermedades crónicas. También es conocido el papel que pueden llegar a desempeñar ciertos compuestos naturales como agentes antioxidantes [50]. Dado que la pectina puede presentar dichas propiedades [32], se consideró la necesidad de evaluar dicha actividad tras los tratamientos con US.

La Figura 30 representa los valores de absorbancia tras la reacción de las muestras con el DPPH. Como puede observarse, la pectina de manzana sin tratar presenta una ligera disminución en la absorbancia respecto al blanco realizado con DPPH, lo que podría indicar una leve actividad antioxidante. Dichos valores de absorbancia, apenas variaron a lo largo de los tratamientos, no existiendo diferencias significativas. Estos resultados indican que la despolimerización causada por efecto de los US no afectó negativamente a la actividad antioxidante de la pectina de manzana. La pectina de cítricos sin tratar por US presentó un valor de absorbancia muy similar al del DPPH (blanco), no exhibiendo apenas actividad antioxidante. Tras los tratamientos con US se vio un ligero aumento de absorbancia, especialmente tras 30 min en el equipo de 450 W, lo que podría indicar la

posible formación de compuestos oxidantes, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Hasta nuestro conocimiento, no existen trabajos previos en los que se estudie la actividad antioxidante de pectinas despolimerizadas mediante US. En la literatura se han descrito resultados variables tras el tratamiento de polisacáridos de algas con sonda de US [57]. Así, los tiempos y demás condiciones de los tratamientos con US podrían provocar fenómenos contrapuestos que compensaran sus efectos sobre la actividad antioxidante. Por un lado, la disminución de Mw que está directamente relacionada con la escisión de cadenas laterales y en consecuencia, con la liberación de azúcares reductores podría fomentar un aumento de la actividad antioxidante. Por otro lado, la formación de radicales libres durante tiempos largos induce a la reducción de la actividad antioxidante.

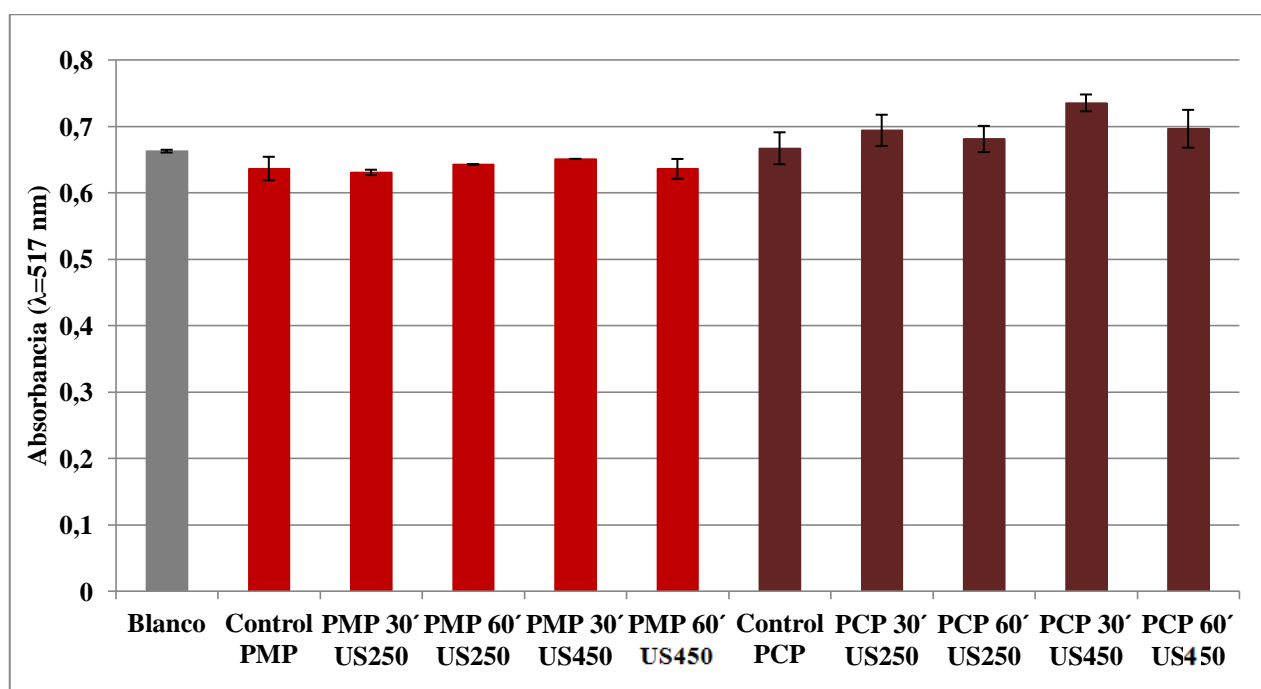


Figura 30. Representaciones gráficas del efecto de los tratamientos con sonda US sobre la actividad antioxidante de PMP y PCP.

5. CONCLUSIONES

1. De los métodos de despolimerización ensayados, con ácidos, con baño de ultrasonidos y con sonda de ultrasonidos, sólo el último ocasionó cambios significativos en la Mw de las pectinas.
2. La aplicación conjunta de ácido nítrico y US no supuso ningún beneficio adicional al tratamiento sólo con US.
3. En los tratamientos realizados con sonda de US las condiciones que condujeron a una mayor despolimerización fueron 450 W, 30% de amplitud, 45°C y 60 min.
4. Las pectinas de manzana y de cítricos mostraron diferente comportamiento al tratamiento con US, siendo la última mucho más susceptible que la primera, ya que los porcentajes de despolimerización, en las condiciones más enérgicas, fueron 51 y 87%, respectivamente.
5. El grado de esterificación de la pectina de manzana disminuyó con la severidad del tratamiento con sonda de US, obteniéndose pectinas de bajo metoxilo tras las condiciones óptimas de despolimerización.
6. El contenido en ácido galacturónico sólo se vio afectado significativamente en las muestras de pectina de manzana.
7. Apenas se observaron cambios en la actividad antioxidante de las pectinas tras el tratamiento de despolimerización con sonda de US, demostrando la inocuidad de esta tecnología sobre el potencial antioxidante de estos polisacáridos.

Los resultados presentados en esta memoria indican que los ultrasonidos de potencia, utilizados en las condiciones aquí descritas, constituyen una eficaz herramienta para reducir estructuralmente las uniones de los azúcares de las pectinas. Por ello, sería de interés seguir profundizando en esta línea de investigación con el fin de poder conocer en mayor medida la relación estructura-función de estos compuestos y poder revalorizar la materia prima de origen.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Directiva98/2008/CE. http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluación-ambiental/participacion-publica/Directiva_Marco_2008_98_CE_sobre_los_residuos_tcm7-3846.pdf
- [2] Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ley de residuos y suelos contaminados. <http://www.boe.es/boe/dias/2011/07/29/pdfs/BOE-A-2011-13046.pdf>
- [3] Parlamento Europeo. La eficiencia de los recursos y los residuos, 2015. http://www.europarl.europa.eu/ftu/pdf/es/FTU_5.4.6.pdf
- [4] Gobierno de Aragón. Guía Orientativa dirigida a PYMES sobre la transposición de la directiva marco de residuos a la normativa española. La nueva ley de residuos. (2011). http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/AgriculturaGanaderiaMedioAmbiente/MedioAmbiente/Areas/11_Residuos/guia_pymes_residuos.pdf
- [5] Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. (2012). *Química de los Alimentos*. 3ª Ed. Madrid: Editorial Acribia.
- [6] Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición Juárez. M. (2007). *Alimentos funcionales. La evaluación de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos*. Santander: Universidad Internacional Menéndez Pelayo. http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/otras_actividades/UIMP_seg_alimentaria_nutricion/M_Juarez.pdf
- [7] Gil, A. *Tratado de Nutrición*, Tomo II. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2010.
- [8] May, C.D. (1990). Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* **12**, 79-99.
- [9] Holck, J., Hotchkiss, A., Meyer, A., Mikkelsen, J. & Rastall, R. (2014). Production and bioactivity of pectin oligosaccharides from fruit and vegetable biomass in *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. Ed. Moreno, F.J. & Sanz, M.L. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, United Kingdom.
- [10] Soria, A.C., Villamiel, M. & Montilla, A. (2015). Ultrasound effects on processes/reactions involving carbohydrates in *Ultrasound in Food Processing: Recent Advances*. Ed. M. Villamiel, J.V. García-Pérez, J. Cárcel and J.J. Benedito. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, United Kingdom. (en prensa)
- [11] Morris, V.J., Belshaw, N.J., Waldron, K.W. & Maxwell, E.G. (2013). The bioactivity of modified citrus pectin fragments. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* **1**, 21-37.
- [12] Gomez, B., Gullon, B., Yanez, R., Parajo, J. C. & Alonso, J. L. (2013). Pectic Oligosaccharides from Lemon Peel Wastes: Production, Purification, and Chemical Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 10043-10053.
- [13] Beli, R., Rakesh. & Avtar., K. (1997). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Food Science and Nutrition* **37**, 47-73.
- [14] Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas. Informe Económico 2014. Foco en algunos sectores. http://www.fiab.es/archivos/documentoMenu/documentomenu_20150521072708.pdf

- [15] Mercados Centrales de Abastecimiento (MERCASA). Alimentación en España 2014. Producción, industria, distribución y consumo. http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion_2014/pdfs/pag_097-163_frutas_frutos_secos_y_hortalizas.pdf
- [16] O'Shea, N., Ktenioudaki, A., Smyth, T. P., McLoughlin, P., Doran, L., Auty, M. A. E., Arendt, E. & Gallagher, E. (2015). Physicochemical assessment of two fruit by-products as functional ingredients: Apple and orange pomace. *Journal of Food Engineering* **153**, 89-95.
- [17] Ridley, B.L., O'Neill, M.A. & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-967.
- [18] Caffall, K. H. & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* **344**, 1879-1900.
- [19] Willats, W.G.T., Knox, P. & Mikkelsen, J.D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* **17**, 97-104.
- [20] Novosel'skaya, I. L., Voropaeva, N. L., Semenova, L. N. & Rashidova, S. S. (2000). Trends in the science and applications of pectins. *Chemistry of Natural Compounds* **36**, 1-10.
- [21] Zhang, L. F., Zhang, X. Z., Liu, D. H., Ding, T. & Ye, X. Q. (2015). Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin. *Food Science and Technology* **61**, 630-637.
- [22] Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y. & Liu, D. (2013a). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry* **20**, 222-231.
- [23] Zhang, L., Xingqian, Y., Xue, S.J., Zhang, X., Liu, D., Meng, R. & Chen, S. (2013b). Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties and nanostructure of citrus pectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**, 2028-2036.
- [24] Thakur, B. R., Singh, R. K. & Handa, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **37**, 47-73.
- [25] Seshadri, R., Weiss, J., Hulbert, G.J. & Mount, J. (2003). Ultrasonic processing influences rheological and optical properties of high-methoxyl pectin dispersions. *Food Hydrocolloids* **17**, 191-197.
- [26] Wikiera, A., Irla, M. & Mika, M. (2014). Health-promoting properties of pectin. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej* **68**, 590-596.
- [27] Ramli, N. & Asmawati. (2011). Effect of ammonium oxalate and acetic acid at several extraction time and pH on some physicochemical properties of pectin from cocoa husks (*Theobroma cacao*). *Africal Journal of Food Science* **5**, 790-798.
- [28] Dhall, R. K. (2013). Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 435-450.
- [29] Wong, J.M.W., de Souza, R., Kendall, C.W.C., Emam, A. & Jenkins, D.J.A. (2006). Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* **40**, 235-243.
- [30] Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickman, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C. & Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science Technology Bulletin: Functional Foods* **7**, 1-19.

- [31] Yamada, H. (1996). *Contribution of pectins on health care*. Japón: Editorial Elsevier Science.
- [32] Glinsky, V. & Raz, A. (2009). Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate Research* **344**, 1788-1791.
- [33] Chen, J., Liu, W., Liu, C. M., Li, T., Liang, R. H. & Luo, S. J. (2015). Pectin Modifications: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**, 1684-1698.
- [34] Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J. & Serra, J. (1998). Industrial applications of pectin enzymes: a review. *Process Biochemistry* **33**, 21-28.
- [35] Soria, A.C. & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Food Science & Technology* **21**, 323-331.
- [36] Villamiel M. & de Jong P. (2000). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of Food Engineering* **45**, 171-179.
- [37] Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: a review. *Food Control* **31**, 593-606.
- [38] Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D. & Youssef, M.M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. *Food Research International* **48**, 410-427.
- [39] Karaman, S., Yilmaz, M.T., Ertugay, M.F., Baslar, M. & Kayacier, A. (2012). Effect of ultrasound on steady and dynamic shear properties of glucomannan based salep dispersions: Optimization of amplitude level, sonication time and temperature using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* **19**, 928-938.
- [40] Liu, H., Bao, J., Du, Y., Zhou, X. & Kennedy, J.F. (2006). Effect of ultrasonic treatment on the biochemophysical properties of chitosan. *Carbohydrate Polymers* **64**, 553-559.
- [41] Panchev, I.N., Kirtchev, N.A. & Kratchanov, Chr.G. (1994). On the production of low esterified pectins by acid maceration of pectic raw materials with ultrasound treatment. *Food Hydrocolloids* **8**, 9-17.
- [42] Corzo-Martínez M., Villamiel M. & Moreno F.J. (2015). Protein modifications during processing and glycation by ultrasound en *Ultrasound in Food Processing: Recent Advances*. Ed. M. Villamiel, J.V. García-Pérez, J. Cárcel and J.J. Benedito. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, United Kingdom. (en prensa)
- [43] Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acid. *Analytical Biochemistry* **54**, 484-489.
- [44] Zuluaga, J., Rodriguez, N., Rivas-Ramirez, I., de la Fuente, V., Rufo, L. & Amils, R. (2011). An Improved Semiquantitative Method for Elemental Analysis of Plants Using Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Biological Trace Element Research* **144**, (1-3), 1302-1317.
- [45] Garna, H., Mabon, N., Nott, K. Wathelet, B. & Paquot, M. (2006). Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and qualification by ionic chromatography. *Food Chemistry* **96**, 477-484.

- [46] Singthong, J., Cui, S., Ningsanond, S. & Goff, H. (2004). Structural characterization, degree of sterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polimers* **58**, 391-400.
- [47] Sumner, J. B. & Howell, S. F. (1935). Method for determination of saccharase activity. *The Journal of Biological Chemistry January* **108**, 51-54.
- [48] Jiménez A.M., Sánchez M. & Martínez, M. (2012). Optimization of the DPPH method to evaluate antioxidant activity of coffee brew. *Anales de Veterinaria de Murcia* **28**, 67-78.
- [49] Matsunaga, T. & Ishii, T. (2004). Characterization of Metal Binding Properties of Rhamnogalacturonan II from Plant Cell Walls by Size-Exclusion HPLC/ICP-MS. *Analytical Sciences* **20**, 1389-1393.
- [50] Jae, H., Young, I., Lee, Suyong, Yoo, S.H., Chang, P.S. & Gyu, H. (2011). Enhancement of anti-radical activity of pectin from apple pomace by hydroxamation. *Food Hydrocolloids* **25**, 545-548.
- [51] Yapo, B.M (2009). Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. *Bioresource Technology* **100**, 3147-3151.
- [52] Matus, F., Herrera, R. & Smulders, F. (2005). Absolute determination of the power output and energy dissipated into pure water by an ultrasonic probe. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **5**, 23-29.
- [53] Spohr, S., Giovanetti, M.H., Granato, D., Demezuk, B., Maciel, G.M., Stafussa, A.P. & Windson, C. (2015). Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. *Journal Food Science & Technology* **52**, 4102-4112.
- [54] Min, B., Lim, J., Ko, S., Lee, K. G., Lee, S. H. & Lee, S. (2011). Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. *Bioresource Technology* **102**, 3855-3860.
- [55] Chatjigakis, A.K., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O. & Rodis, P. & Polissiou, M. (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers* **37**, 395-408.
- [56] Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C., Herrera, A. & Martínez, R. (2010). *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Barcelona: Editorial Elviesier Masson.
- [57] Guo, X., Ye, X., Sun, Y., Wu, D., Wu, N., Hu, Y. & Chen. S. (2014). Ultrasound Effects on the Degradation Kinetics, Structure, and Antioxidant Activity of Sea Cucumber Fucoidan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 1088-1095.